

MARCO ANTONIO BITENCOURT

**O TRATAMENTO DA ANEMIA APLÁSTICA SEVERA ADQUIRIDA  
COM A COMBINAÇÃO DE CICLOSPORINA E PREDNISONA.  
ANÁLISE DE 117 PACIENTES**

Dissertação apresentada para conclusão  
do Curso de Mestrado em Medicina  
Interna, do Departamento de Clínica  
Médica do Setor de Ciências da Saúde  
da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pasquini

CURITIBA

1998



## PARECER

*Parecer Conjunto dos Professores Dr. Ricardo Pasquini, Dr. Roberto Passeto Falcão e Dr. Sérgio Ossamu Yoshii sobre a Dissertação de Mestrado em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná, elaborada pelo Dr. MARCO ANTONIO BITENCOURT, intitulada "O TRATAMENTO DA ANEMIA APLÁSTICA SEVERA ADQUIRIDA COM A COMBINAÇÃO DE CICLOSPORINA E PREDNISONA. ANÁLISE DE 117 PACIENTES".*

*A Banca Examinadora considerou que a Dr. MARCO ANTONIO BITENCOURT, apresentou trabalho adequado para Dissertação de Mestrado e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, atribuindo-lhe Conceito "A", correspondente ao Grau "B" sendo pois unanimemente recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de Mestre em Medicina Interna e a publicação da Dissertação em veículo de divulgação conveniente, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições.*

*Curitiba, 20 de novembro de 1998.*

  
Prof. Dr. Ricardo Pasquini

  
Prof. Dr. Roberto Passeto Falcão

  
Prof. Dr. Sérgio Ossamu Yoshii

Dedico este trabalho aos pacientes do estudo, que, no decorrer da dissertação, foram lembrados como “casos”, “doentes” e “pacientes”.

A todos que, de forma direta ou indireta,  
auxiliaram tornando possível esta  
realização.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 ASPECTOS CLÍNICOS DA AAS.....</b>	<b>3</b>
1.2.1 INCIDÊNCIA.....	3
1.2.2 ETIOLOGIA.....	3
1.2.3 FISIOPATOLOGIA.....	7
1.2.4 CLASSIFICAÇÃO.....	11
1.2.5 HISTÓRIA NATURAL.....	13
<b>1.3 TRATAMENTO DA AAS .....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
<b>3 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>51</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>52</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - INCIDÊNCIA DA ANEMIA APLÁSTICA-REVISÃO DE LITERATURA.....	4
TABELA 2 - CAUSAS DA ANEMIA APLÁSTICA ADQUIRIDA .....	4
TABELA 3 - AGENTES QUÍMICOS E DROGAS ASSOCIADOS À AAS .....	5
TABELA 4 - CLASSIFICAÇÃO ETIOLÓGICA DA ANEMIA APLÁSTICA .....	12
TABELA 5 - RESULTADOS DOS PRINCIPAIS TRABALHOS DE IMUNOSSUPRESSÃO EM AAS .....	21
TABELA 6 - CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DA ANEMIA APLÁSTICA SEVERA .....	24
TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS INICIAIS.....	24
TABELA 8 - ESQUEMA DE TRATAMENTO .....	26
TABELA 9 - COMPLICAÇÕES DO TRATAMENTO POR ÉPOCA E NÚMERO DE PACIENTES. ....	34
TABELA 10 - CAUSAS E DIAS DOS ÓBITOS E A REPOSTA OBTIDA.....	35
TABELA 11 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS RESPONDEDORES E NÃO-RESPONDEDORES .....	36
TABELA 12 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS POR PERÍODO DE ENTRADA.....	39
TABELA 13 - ANÁLISE MULTIVARIADA - PERÍODO 1989-1992.....	41
TABELA 14 - IDADE X TRANSFUSÕES PRÉVIAS - 1993-1996.....	43
TABELA 15 - IDADE X CONTAGEM DE PLAQUETAS - 1993-1996.....	43
TABELA 16 - ANÁLISE MULTIVARIADA - 1993-1996.....	43

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DESTRUIÇÃO IMUNE DA HEMATOPOESE .....	10
FIGURA 2 - MECANISMO DE AÇÃO DOS PRINCIPAIS IMUNOSSUPRESSORES .....	19
FIGURA 3 - IDADE AO DIAGNÓSTICO .....	28
FIGURA 4 - DURAÇÃO DA DOENÇA .....	28
FIGURA 5 - GRANULÓCITOS AO DIAGNÓSTICO .....	29
FIGURA 6 - PLAQUETAS AO DIAGNÓSTICO .....	29
FIGURA 7 - EVOLUÇÃO GLOBAL NO PRIMEIRO ANO DE SEGUIMENTO.....	31
FIGURA 8 - SOBREVIDA GLOBAL .....	33
FIGURA 9 - SOBREVIDA DE ACORDO COM A RESPOSTA OBTIDA .....	33
FIGURA 10 - SOBREVIDA DE ACORDO COM PLAQUETAS INICIAIS .....	37
FIGURA 11 - SOBREVIDA DE ACORDO COM GRANULÓCITOS INICIAIS .....	37
FIGURA 12 - SOBREVIDA DE ACORDO COM O NÚMERO DE TRANSFUSÕES PRÉVIAS .....	38
FIGURA 13 - SOBREVIDA DE ACORDO COM A DURAÇÃO DE DOENÇA .....	38
FIGURA 14 - SOBREVIDA DE ACORDO COM O PERÍODO DE ENTRADA NO ESTUDO.....	40
FIGURA 15 - DURAÇÃO DE DOENÇA X SOBREVIDA 1989-1992.....	41

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**AA** – Anemia Aplástica

**AAS** – Anemia Aplástica Severa

**MO** – medula óssea

**TMO** – transplante de medula óssea

**GAL** – Globulina antilinfocítica

**GAT** – Globulina antitimocítica

**CSA** – ciclosporina-A

**STMO** – Serviço de Transplante de Medula Óssea

**PRD** - prednisona

**HPN** – Hemoglobinúria Paroxística Noturna

**G-CSF** – Fator estimulador de colônias granulocíticas

**GM-CSF** – Fator estimulador de colônias granulocíticas e macrófágicas

**IL-3** – Interleucina 3

**HLA** – Antígeno leucocitário humano

**TNF** – Fator de necrose tumoral

**RC** – Resposta completa

**RP** – Resposta parcial

**SR** – Sem resposta



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Em 1888 Paul Erlich descreveu o caso de uma mulher jovem que morreu após o aparecimento de uma doença explosiva e de curta duração, caracterizada por anemia intensa, sangramento de pele, mucosas e retina, além de febre alta. Na autópsia ele observou uma medula óssea vazia e substituída por gordura. Esta doença foi por ele chamada de "depressão primária da função medular"<sup>1</sup>. O termo "aplástica" foi introduzido na literatura em 1904 por M. Chauffard, ao descrever um caso de "anemia perniciosa aplástica", com o sentido de uma depressão global da medula óssea. Em meados deste século, propôs-se que o termo "anemia aplástica" ficasse reservado às situações de pancitopenia com evidente diminuição na produção de todos os elementos do sangue pela medula óssea, não associado a doença primária que infiltrasse, substituísse ou suprimisse o tecido hematopoético ativo<sup>2</sup>. Atualmente é considerada não uma doença única mas um grupo de enfermidades.

A anemia aplástica severa adquirida (AAS), sendo um segmento do grupo acima, por ter critérios diagnósticos muito bem definidos, e também ser mais homogênea no que se refere à sua patogenia, história natural e terapêutica, presta-se mais apropriadamente para um estudo clínico.

É uma doença rara e grave, que acomete indivíduos de qualquer idade. Sua gravidade está diretamente relacionada à intensidade da pancitopenia na sua

apresentação, especialmente aos granulócitos e plaquetas. A sobrevida para os pacientes que recebem apenas tratamento de suporte ou somente andrógenos é de 50% no primeiro ano, permanecendo vivos apenas 20% ao final de dez anos<sup>3</sup>.

O transplante de medula óssea (TMO), como opção para repovoar a medula óssea vazia, tornou-se viável no fim da década de 60 e passou a ser o tratamento de escolha para portadores desta doença, desde que tivessem um doador histocompatível e situação clínica que permitissem a sua realização, o que só acontece, infelizmente, em 25 a 30% dos pacientes.

A percepção da existência de um mecanismo imune na patogenia da AAS levou a considerar-se o uso de agentes imunossupressores no seu tratamento. A introdução da globulina antilinfocítica (GAL) e antitimocítica (GAT) na década de 70 no tratamento da AAS, mostrou recuperação medular em 40 a 60% dos pacientes que as receberam<sup>4</sup>, estimulando que várias modificações fossem sendo feitas incluindo associação de agentes imunossupressores, com resultados variáveis e, na década de 80, ciclosporina-A (CSA) passou também a ser utilizada<sup>5-7</sup>.

O Serviço de Transplante de Medula Óssea (STMO) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, sentindo a necessidade de proporcionar tratamento adequado aos portadores de AAS e que não tinham condições de serem submetidos à TMO, iniciou, em 1989, um programa de tratamento com a combinação da CSA e de prednisona (PRD), que é o objeto desta dissertação.

## 1.2 ASPECTOS CLÍNICOS DA AAS

### 1.2.1 INCIDÊNCIA

A incidência anual da AAS varia de 2 a 6 casos/ $10^6$  habitantes/ano de acordo com as séries publicadas. O maior e melhor trabalho epidemiológico é o realizado pelo International Aplastic Anemia and Agranulocytosis Study, feito na Europa e Israel no início da década de 80, que analisou um total de 112 milhões de pessoas por ano, e identificou 208 casos da doença, sendo a incidência global de 2 casos/ $10^6$  habitantes/ano<sup>8</sup> (tabela 1). Este trabalho mostra que a ocorrência é maior em mulheres (2,3 casos/ $10^6$ /ano) do que em homens (1,2 casos/ $10^6$ /ano). Considerando a idade no diagnóstico observa-se dois picos de maior incidência, sendo de 15 a 25 anos o primeiro, e maior que 60 anos o segundo.

Mais recentemente um trabalho realizado na Tailândia mostrou uma incidência de 3,7 casos/ $10^6$  habitantes/ano na região de Bangkok, três vezes maior que nas outras séries<sup>9</sup>.

### 1.2.2 ETIOLOGIA

As AA são um grupo heterogêneo de doenças e as suas causas podem ser atribuídas a agentes físicos, químicos, drogas, agentes virais, agindo diretamente ou por mecanismos imunes. As tabelas 2 e 3 mostram as possíveis causas da AA.

TABELA 1 -INCIDÊNCIA DA ANEMIA APLÁSTICA-REVISÃO DE LITERATURA <sup>9,14</sup>

PERÍODO	LOCAL	TIPO PESQUISA	ORIGEM DE CASOS	Nº DE CASOS	INCIDÊNCIA (por 10 <sup>6</sup> hab/ano)
1961-1965	Israel	?	PM	93	7,8
1970-1978	EUA	R	PM/AO	94	6,6
1970-1981	EUA	R	PM/AO	20	8,6
1980-1984	Europa e Israel	P	PM	168	2,2
1971-1978	Inglaterra	R	PM	174	6,8
1985	Reino Unido	P	?	49	2,3
1966-1977	Buenos Aires	R	PM	35	6,1
1984-1987	França	P	PM	250	1,4
1989-1993	Tailândia	P	PM	152	3,7

R = retrospectivo, P = prospectivo, PM = prontuário médico, AO = atestado de óbito

TABELA 2 - CAUSAS DA ANEMIA APLÁSTICA ADQUIRIDA<sup>10</sup>


---

Radiação Ionizante

Agentes Químicos e Drogas (ver tabela 3)

Agentes Virais :

- Epstein-Baar
- Hepatite não-A, não-B, não-C, não-D, não-E, não-G
- Vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida

Doenças Imunes :

- Fasciíte Eosinofílica
- Timoma
- Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro

Hemoglobinúria Paroxística Noturna

Gestação

---

TABELA 3 - AGENTES QUÍMICOS E DROGAS ASSOCIADOS À AAS\*<sup>11</sup>

I - Agentes que regularmente produzem depressão medular:
Agentes Citostáticos :
- Alquilantes = bussulfan, melfalan, ciclofosfamida
- Antimetabólicos = methotrexate
- Antimitóticos = vincristina, vinblastina
- Antibióticos = daunorrubicina, doxorubicina
Benzeno e seus derivados
II - Agentes possivelmente associados, mas com risco relativamente baixo :
Cloranfenicol
Inseticidas
Antiprotozoários = cloroquina e quinacrina
Anti-inflamatórios Não Hormonais = fenilbutazona, indometacina, ibuprofeno, aspirina
Anticonvulsivantes = difenilhidantoína e carbamazepina
Ouro, arsênico, bismuto e mercúrio
III - Agentes raramente associados :
Antibióticos = estreptomicina, tetraciclina, ampicilina, mebendazol e sulfas
Anti-histamínicos = cimetidina, ranitidina, clorfeniramina
Sedativos = clorpromazina
$\alpha$ -Metildopa
Quinidina

\* Os mais citados na literatura.

Quanto à radioterapia, ocorre hipoplasia de medula óssea em exposição corporal total, numa dose entre 1,5 a 2,0 Gy. Exposições letais em animais começam em 4 Gy e tornam-se incompatíveis com a vida aos 8 Gy<sup>12</sup>. Autópsias em vítimas da bomba atômica no Japão mostraram medula óssea acelular naqueles que morreram dentro das duas primeiras semanas da exposição, mas havia regeneração medular nos que sobreviveram mais do que 6 semanas.

Depressões temporárias das contagens hematimétricas, especialmente leucócitos e plaquetas, são freqüentemente observadas em infecções virais comuns. O papel das infecções virais em formas permanentes de AA é cada vez mais reconhecido, pois diferentes famílias de vírus podem infectar células da MO induzindo dano, tanto celular direto, quanto indiretamente por mecanismo imune. A AA pode se seguir a um episódio de hepatite aguda. Esta associação não é rara e mais de 300 casos podem ser encontrados na literatura<sup>13,14</sup>, sendo sua incidência de 2 a 5% em algumas séries<sup>15</sup>.

A depressão medular ocorre justamente quando está havendo regressão do quadro da hepatite, ou seja, aproximadamente 2 meses após seu aparecimento. Muitos poderão ter hepatite subclínica a julgar pelo número de pacientes que tem transaminases aumentadas mesmo antes de receberem sua primeira transfusão<sup>16</sup>. O vírus da hepatite associado à AA ainda não foi isolado e os vírus A, B, C, D, E e G não estão envolvidos<sup>17</sup>. Alguns casos de AA são descritos após infecção aguda por vírus Epstein-Baar, mas em alguns há descrição de reversão espontânea<sup>18</sup>.

Estudos retrospectivos desta doença associados a vírus e drogas indicam um período de latência de 6 a 8 semanas desde o evento inicial com o início da pancitopenia<sup>19</sup>, mas pode ser bem mais prolongado se for moderada ou se for bem tolerado.

Anemia Aplástica e gestação parece ser circunstancial.

Agranulocitose e AA são os efeitos colaterais a drogas, relativos ao sistema hematopoético, mais freqüentemente descritos na literatura. Mas, mesmo quando a associação de uma droga e AA é inquestionável, o risco estimado de desenvolver AA permanece muito pequeno<sup>20</sup>. Cloranfenicol é uma das mais implicadas drogas na etiologia da AA. O risco estimado para um tratamento com esta droga é de 1/20.000 a 1/60.000, e dois mecanismos são possíveis: o primeiro depende da dose empregada, sendo o aparecimento da AA precoce, podendo ser reversível com a sua suspensão. O segundo mecanismo é tardio, progressiva e freqüentemente fatal, acontecendo semanas ou meses após sua suspensão. Sua ação parece ser, após sua conversão para o nitrosocloranfenicol pelas bactérias intestinais, a degradação e inibição da síntese do DNA na MO impedindo a hematopoese<sup>21</sup>, no entanto, trabalho

realizado na Tailândia não encontrou correlação entre cloranfenicol e AA<sup>9</sup>, fato que leva a conclusão de que fatores genéticos podem estar envolvidos.

O benzeno e seus derivados, largamente utilizado na indústria, é o agente químico que mais comumente induz pancitopenia, sendo este fenômeno conhecido há 100 anos e descrito inicialmente na Suécia. Este agente, através de reação de oxidação é transformado em epóxido de benzeno, que reage com ácidos nucleicos e proteínas, determinando lesão celular.

Ainda, no trabalho realizado na Tailândia, há nítida relação com o baixo nível sócio e econômico da população sendo a maior incidência em indivíduos com menos de 4 anos de estudos, os que nasceram em região rural e nas famílias com renda mensal menor que US\$ 60,00<sup>9</sup>.

Citostáticos podem determinar AA irreversível quando doses maciças são empregadas, o que não ocorre nos esquemas convencionais de quimioterapia.

Aproximadamente 70% das AA são idiopáticas.

### 1.2.3 FISIOPATOLOGIA

São propostos três mecanismos envolvidos na patogenia da AA : 1) lesão intrínseca da célula tronco, 2) supressão imune da hematopoese e 3) alteração do microambiente da MO<sup>22</sup>.

O sucesso, em alguns casos, de transplante singênico respondendo a simples infusão de MO, o aumento de anormalidades nucleares em alguns pacientes com AA, as anormalidades cromossômicas nos portadores de Anemia de Fanconi, e o fato de que os defeitos celulares são encontrados nas três linhagens celulares nos portadores de Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN), sugerem um defeito

intrínseco da célula tronco hematopoética. Ainda, o conteúdo de células capazes de formar colônias *in vitro* é reduzida nos pacientes com AA, tanto a CFU-C como a BFU-E, a despeito da adição de uma quantia ótima de fatores de crescimento hematopoético<sup>23</sup>.

Estudos mais recentes indicam um profundo déficit nas células progenitoras em todos os pacientes com AAS, e, no momento do diagnóstico, o número destas células na medula é usualmente menor que 10% do normal, e o número absoluto de células tronco é, provavelmente, não mais do que 1% do normal.

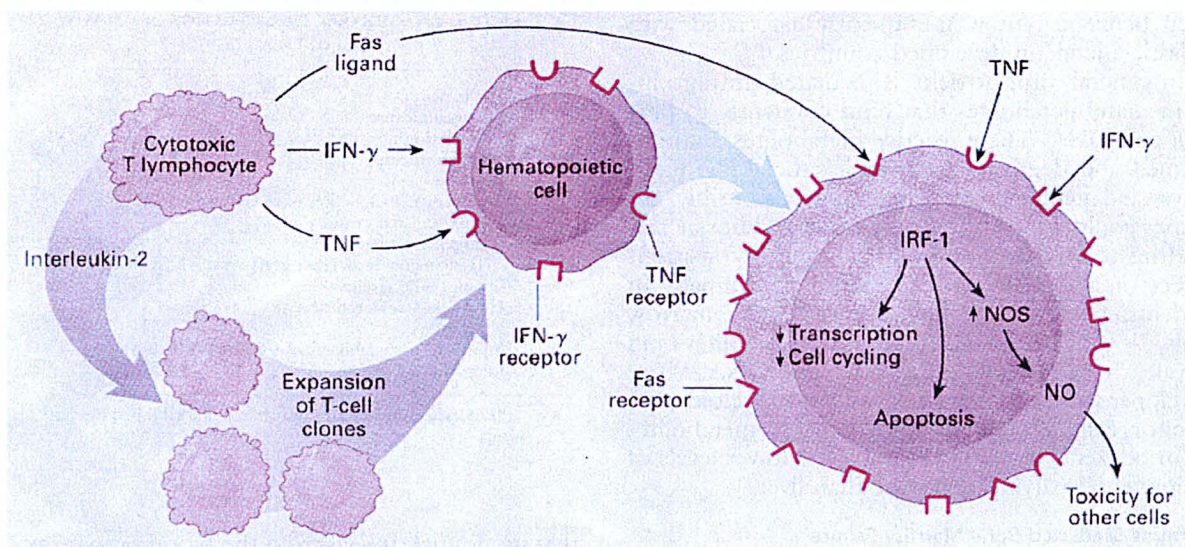
A mais forte evidência para o envolvimento do sistema imune na patofisiologia da AA é a melhora da função hematopoética após tratamentos imunossupressores e, na maioria dos transplantes singênicos só acontece a pega do enxerto se tiver condicionamento prévio com ciclofosfamida. A observação de recuperação autóloga da hematopoese após transplantes alogênicos é outra forte evidência do envolvimento do sistema imune na fisiopatologia da AA. Além disso, um grande número de fenômenos imunes *in vitro* foram relatados. Um experimento mostrou que células mononucleares do sangue ou da medula de pacientes com AA suprimem a formação de colônias hematopoéticas de células de uma medula normal, e que a remoção das células T das amostras dos pacientes aumentava, algumas vezes, a formação das colônias. Provou-se ser o interferon- $\gamma$  a substância que tem atividade inibitória no sobrenadante das culturas de células dos pacientes. As células T dos pacientes em culturas, ou quando clonadas, produzem mais interferon- $\gamma$  e fator de necrose tumoral, duas citocinas que inibem a formação de colônias hematopoéticas *in vitro*. Também o sangue e a medula de pacientes contém um número aumentado



de linfócitos citotóxicos ativados, e, tanto o número quanto a atividade destas células diminuem após a terapia com globulina antitimocítica<sup>24</sup>.

Em culturas tissulares, o interferon- $\gamma$  e o fator de necrose tumoral suprimem a proliferação de células progenitoras hematopoéticas, e esta supressão é maior quando estas substâncias são secretadas dentro do microambiente da medula óssea, do que quando são adicionadas às culturas. O interferon- $\gamma$  e o fator de necrose tumoral suprimem a hematopoese pelo seu efeito no ciclo mitótico, mas outro importante componente da inibição é a morte celular. A apoptose é iniciada pela indução da expressão do receptor Fas nas células CD34, bem como a ativação deste receptor por suas ligantes. As células hematopoéticas de pacientes com anemia aplástica expressam o receptor Fas e a medula contém um número aumentado de células apoptóticas<sup>24,25</sup>.

O evento imunológico que precede a destruição celular é muito menos claro. O envolvimento de linfócitos CD4 ou "helper" é observado em uma maior representação do HLA-DR2 em pacientes brancos portadores desta doença, e um haplótipo mais específico do HLA foi encontrado em pacientes japoneses que responderam a terapia com ciclosporina, que é DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602<sup>26</sup>.

FIGURA 1 - DESTRUIÇÃO IMUNE DA HEMATOPOESE <sup>24</sup>

## Legenda:

Cytotoxic T Lymphocyte - Linfócito T Citotóxico

Interleukin-2 - Interleucina 2

IFN-γ - Interferon γ

TNF - Fator de Necrose Tumoral

Fas Ligand - Fas ligante

Hematopoietic Cell - Célula hematopoética

IFN-γ receptor - receptor de Interferon γ

TNF receptor - receptor do Fator de Necrose Tumoral

Fas receptor - receptor do Fas

IRF-1 - fator regulador do Interferon 1.

Transcription - transcrição

Cell cycling - ciclo celular

Apoptosis - apoptose

Expansion of T Cell Clones - expansão de células T

NOS - indutor da síntese do óxido nítrico

NO - óxido nítrico

Toxicity for other cells - toxicidade para outras células

Alguns antígenos do HLA podem ser mais comuns em subgrupos de pacientes com AA, por exemplo, naqueles que respondem a ciclosporina ou que tem AA após hepatite. Apesar disto, tanto o evento desregulador que leva a perda da tolerância e a destruição autoimune da célula hematopoética, bem como a exposição inicial que desencadeia a ativação do sistema imune, são, ainda, desconhecidos<sup>24</sup>.

Os estudos de culturas de células estromais de MO e a avaliação da produção de fatores de crescimento não são convincentes para qualquer anormalidade, exceto nos casos de crianças do sexo feminino que apresentaram baixos níveis de G-CSF. A quantidade de fatores de crescimento obtidas nos sobrenadantes destas culturas mostraram resultados bastante variados, mas a resposta ao tratamento nos pacientes com concentrações altas ou normais de fatores de crescimento é mais rápida e mais freqüente<sup>27</sup>. Porém a utilização destes fatores (G-CSF, GM-CSF, IL-3) no tratamento da AA só determina uma pequena e transitória correção da citopenia. Desta forma, não se pode excluir a participação do microambiente na patogenia da AA.

#### 1.2.4 CLASSIFICAÇÃO

As AA podem ser adquiridas ou constitucionais (Tabela 4). São consideradas adquiridas quando não há qualquer fator predisponente para o seu desenvolvimento e constitucionais quando há associação a determinadas doenças congênitas, genéticas ou familiares<sup>28</sup>.

TABELA 4 - CLASSIFICAÇÃO ETIOLÓGICA DA ANEMIA APLÁSTICA

Anemia Aplástica Adquirida	Anemia Aplástica Constitucional
Idiopática	Anemia de Fanconi
Secundária (ver Tabelas 2 e 3)	Disceratose Congênita
	Síndrome de Schwachman-Diamond
	Trombocitopenia Amegacariocítica
	Anemias Aplásticas Familiares
	Doenças Congênitas Não-Hematológicas = Down, Dubowitz, Seckel.

As AA constitucionais devem ser cuidadosamente investigadas, especialmente a Anemia de Fanconi, pois a estratégia terapêutica é totalmente diferente da forma adquirida. Todos os pacientes portadores de AA abaixo de 20 anos de idade deveriam ser submetidos a estudo citogenético sensibilizado com agentes clastogênicos como o diepoxibutano e a cisplatina, bem como seus irmãos, assintomáticos ou não, pois, eventualmente poderão ser doadores de MO<sup>29</sup>.

Imprescindível também é a classificação da AA adquirida com relação a sua gravidade, pois está diretamente relacionado com o prognóstico, e o tratamento também deverá ser adequado para o grau das citopenias. Esta classificação se faz em moderada, severa e muito severa. Os critérios utilizados para esta classificação são pelo menos dois destes achados em sangue periférico: neutrófilos abaixo de  $500/\text{mm}^3$ , contagem de plaquetas inferior a  $20000/\text{mm}^3$  e contagem de reticulócitos corrigida menor que 1% na presença de anemia, sempre associado com uma celularidade de MO menor que 30% (moderadamente hipocelular) ou 20% (severamente hipocelular). A forma mais grave, ou seja a muito severa, é aquela que

apresenta neutrófilos abaixo de  $200/\text{mm}^3$ . Na forma moderada encaixam-se os quadros cujos valores não são os acima<sup>30</sup>.

#### 1.2.5 HISTÓRIA NATURAL

A maioria dos pacientes procuram auxílio médico devido aos sintomas que aparecem como resultado da queda dos valores hematimétricos normais. As 3 séries podem estar diminuídas, ou a diminuição em uma das séries domina o quadro clínico. Sangramento é a manifestação mais alarmante da pancitopenia, e, geralmente o primeiro sintoma observado pelo paciente. A trombocitopenia manifesta-se normalmente com petéquias na pele, sangramento de gengivas e epistaxe. Muitas vezes o primeiro sinal é metrorragia. Sangramento volumoso em qualquer órgão pode ocorrer mas usualmente acontece numa fase mais tardia da doença e associada à infecções, a medicamentos como os corticóides, ou associado a procedimentos terapêuticos invasivos como passagem de catéter venoso central.

Existe uma grande capacidade dos pacientes em se adaptar a um nível anormalmente baixo de hemoglobina, com o paciente referindo fadiga, dispnéia, zumbidos, palidez acentuada de pele, mas muitos são assintomáticos no que se refere a anemia.

Infecção não é comum no início da doença, mas aparece na sua evolução especialmente naqueles com a forma muito severa da doença, onde é normalmente bacteriana e seu controle depende do número de granulócitos. Porém, na vigência de infecção a pancitopenia se agrava e se estabelece um círculo vicioso de difícil manejo. As infecções fúngicas normalmente aparecem naqueles pacientes com

pancitopenia prolongada e especialmente nos que foram tratados com corticóides e são, muitas vezes, a causa do óbito.

### 1.3 TRATAMENTO DA AAS

Os recursos terapêuticos na AA repousam no transplante de medula óssea, e na terapia de resgate da própria medula utilizando agentes imunossupressores isolados, ou em várias combinações.

Foi em 1939 a primeira infusão de MO para tratamento de AA<sup>31</sup>. Até os anos 60 vários transplantes foram feitos com sucesso entre irmãos gêmeos idênticos (singênico), mas os transplantes alogênicos (irmãos não gêmeos) só tiveram sucesso após a definição do sistema HLA e, a partir da década de 70, passaram a ser feitos sistematicamente, tornando-se o tratamento de escolha para os pacientes que possuísem doador histocompatível<sup>32</sup>. Vários são os fatores que se consideram na sobrevida pós TMO como: idade do receptor, sexo do doador, tempo decorrido entre o diagnóstico e a realização do procedimento, número de transfusões prévias, índice de resposta relativa na cultura mista de linfócitos, tipos de condicionamento utilizados, infecções graves no período anterior ao procedimento, número de células infundidas e tipo de imunoprofilaxia para doença do enxerto contra o hospedeiro utilizada<sup>33</sup>. O STMO do Hospital de Clínicas da UFPR, em atividade desde 1979, já realizou mais de 260 transplantes em AA. Em 104 pacientes cuidadosamente analisados, concluiu-se que a variável de maior importância, no que se refere a sobrevida e rejeição do enxerto pós TMO, é o

número de transfusões prévias ao procedimento recebidas pelo receptor, sendo os pacientes com menos de 15 transfusões os que apresentam a melhor sobrevida, pois 95% são longos sobreviventes<sup>34</sup>. Após esta conclusão, o regime de condicionamento para os pacientes com 15 ou mais transfusões prévias foi modificado e os resultados, embora ainda preliminares, são bastante animadores<sup>35</sup>. Neste grupo a sobrevida global é de 80%, tendo ocorrido a rejeição do enxerto em apenas 7% dos pacientes.

Estima-se que somente 25% dos portadores de AAS são elegíveis para o TMO por não possuírem doadores histocompatíveis, por idade inapropriada, por apresentarem alguma contra-indicação ao procedimento, sendo, portanto, necessário instituir outra modalidade terapêutica. Vários agentes e combinações de agentes são continuamente testados com este propósito, incluindo-se os andrógenos, corticosteróides, GAL, GAT, CSA, e, mais recentemente, os fatores de crescimento hematopoéticos.

Os andrógenos são utilizados há mais de 30 anos, sendo a oximetolona e derivados da testosterona os mais empregados e com resultados semelhantes<sup>36</sup>. A resposta a estes agentes só acontece em situações em que há hematopoese residual, não tendo qualquer resposta quando a hipoplasia é mais intensa. Apresentam múltiplos efeitos colaterais como virilização, hirsutismo e acne, hepatite, retenção hídrica e efeitos psicológicos. Há descrição de casos de tumores hepáticos, adenomas e adenocarcinoma, com uso prolongado do andrógeno. Atualmente seu uso está restrito aos pacientes que não respondem a agentes imunossupressores.

Corticoesteróides, isoladamente, foram utilizados nas décadas de 50 e 60, mas os resultados são difíceis de analisar pela falta de critérios na classificação da doença, bem como de respostas. Mais recentemente foi demonstrada atividade da metilprednisolona em doses maciças<sup>37</sup>, mas tais resultados não foram reproduzidos. Os corticoesteróides como a prednisona e a prednisolona, bem como seus derivados, inibem primariamente a liberação de citocinas dos macrófagos como a IL-1 e TNF- $\alpha$  e a expressão de seus respectivos receptores. Ainda, os corticosteróides também se ligam aos receptores de citocinas nos linfócitos, inibindo assim tanto a liberação de IL-2 pelas células T, como a estimulação das células T pela IL-2. Em doses muito altas mostram, também, atividade linfocitotóxica. Atualmente é consenso entre os hematologistas que o uso isolado de corticóides não traz qualquer benefício.

Em 1970 foram apresentados alguns casos de pacientes que foram submetidos a TMO alogênico, condicionados com GAL, e que apresentavam recuperação autóloga da medula óssea<sup>38</sup>. A partir daí vários ensaios mostraram a eficácia deste agente no tratamento da AA, obtendo-se um significativo aumento da sobrevida no primeiro ano (40 a 70%), comparados com apenas 20% que eram tratados somente com andrógenos<sup>39</sup>. Atividade imunossupressora é certamente o maior papel da GAL e GAT na AA. As preparações disponíveis no mercado são obtidas a partir da imunização de cavalos e coelhos com linfócitos humanos obtidos de sangue periférico e de timo retirado durante cirurgias. Os linfócitos são purificados a cada duas semanas durante 3 meses e injetados nos animais. O plasma é então retirado em frascos apropriados duas vezes por semana e a quantidade final de plasma é processada para a obtenção dos anticorpos finais, que

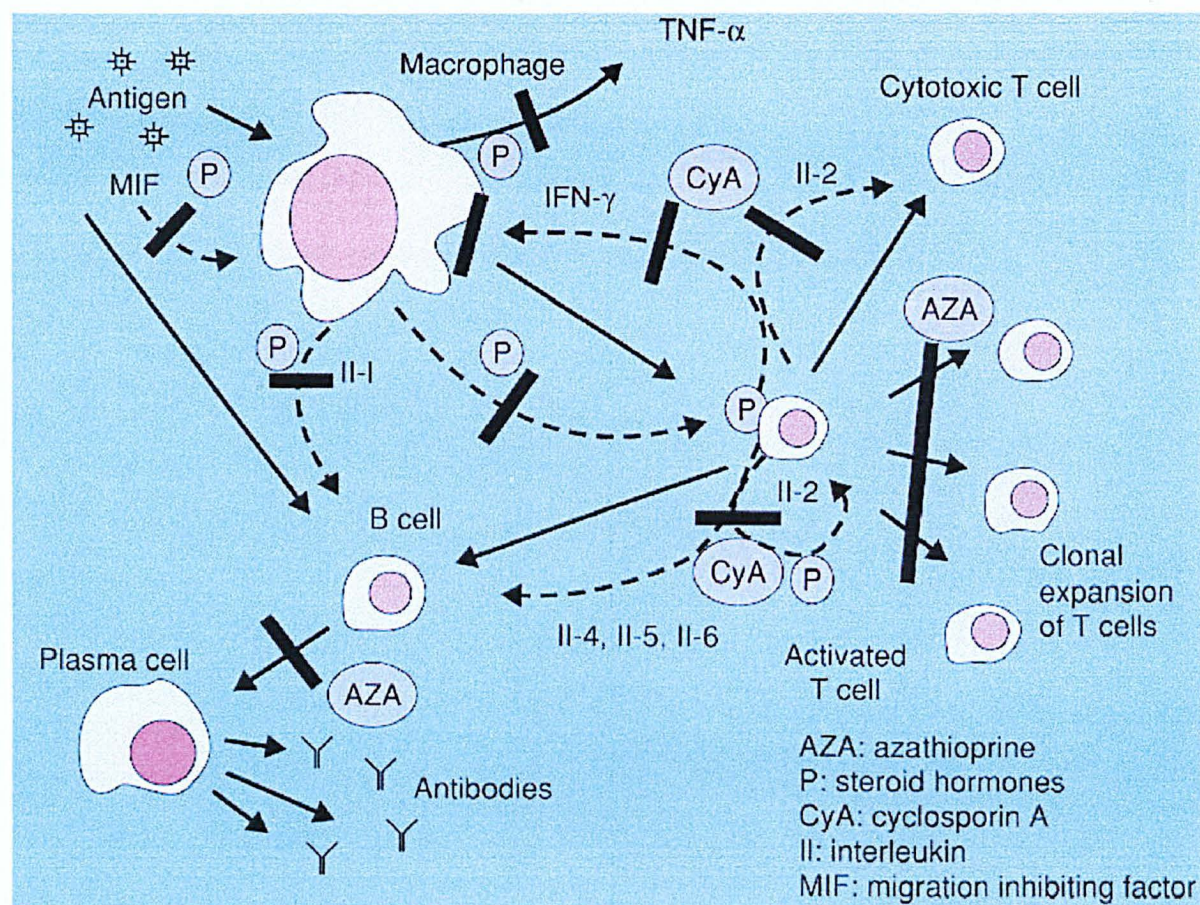


será uma mistura com especificidade e reatividade contra antígenos CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD25 e HLA-DR<sup>40</sup>. Sua administração a pacientes resulta numa rápida redução do número de linfócitos circulantes, usualmente para menos de 10% do valor inicial, e a linfopenia persiste por vários dias após a última infusão. Mesmo quando o número de linfócitos voltar ao inicial, aproximadamente no final de 3 meses, o número de linfócitos ativados permanecerá diminuído. *In vitro*, na ausência de complemento para efetuar a lise celular, GAT e GAL podem estimular a função linfocitária. GAT atua como uma substância mitogênica para aumentar a proliferação linfocitária, provocando a produção de IL-2 e fatores de crescimento hematopoéticos pelas células mononucleares de sangue periférico, identificados como GM-CSF e IL-3. Estes efeitos são exagerados nas células de pacientes com AAS, talvez refletindo o seu já existente estado ativado. Clones de células T, após estimulação com GAL, produzem GM-CSF e IL-3, e menos freqüentemente IL-2 e Interferon- $\gamma$ . Variações na atividade estimulatória das globulinas antilinfocítica e antitimocítica, medidas *in vitro*, têm sido correlacionadas por alguns autores com a resposta clínica ao tratamento, sendo inferior naquelas que têm menor efeito estimulatório<sup>41</sup>. A resposta a estes agentes pode ser apenas parcial e as recaídas não são incomuns. Aqueles que apresentam resposta completa e duradoura podem apresentar discretas alterações displásicas significando a persistência do clone anormal. No período de agosto de 1984 a junho de 1986, 21 pacientes portadores de AA foram tratados com GAT no STMO do HC da UFPR, sendo, na ocasião, um trabalho pioneiro no país. Obteve-se resposta completa em 40% dos casos, sendo que, dos longo sobreviventes, 3 apenas apresentam alterações displásicas<sup>42,43</sup>.

Na década de 80 foram registradas as primeiras evidências da atividade da ciclosporina-A quando usada isoladamente no tratamento da AA<sup>44</sup>. Trabalhos feitos a seguir chegaram a mostrar até 40% de resposta. Um estudo randomizado comparando a CSA com GAT mostrou respostas semelhantes e demonstrou não haver resistência cruzada<sup>45</sup>. A CSA foi isolada no início da década de 70 por Borel e colaboradores, de culturas dos fungos *Tolypocladium inflatum* e *Cylindocarpon lucidum*. É um polipeptídeo cíclico neutro, com massa molecular relativa de 1203. É um imunossupressor bastante potente não sendo citotóxico, mas tendo efeitos inibitórios específicos em células T, bloqueando a transcrição dos genes das citocinas (especialmente IL-2 e IL-4). A expressão dos receptores da IL-2 não é afetada. A CSA é ligada pela ciclofilina, que é uma proteína intracelular, isolada por Hamdschuhmacher e colaboradores, e encontrada na maioria dos tecidos. Este complexo, por sua vez, liga-se a calcineurina, que é essencial para a transcrição final dos genes da maioria das citocinas, como IL-2, IL-4, IL-6, Interferon- $\gamma$ <sup>46</sup>.

A figura 2 mostra esquematicamente a ação dos principais agentes imunossupressores.

Uma vez que agentes imunossupressores isolados mostraram eficácia no tratamento da AA, seguiu-se, então, para o uso combinado. Num estudo multicêntrico do grupo alemão de estudo de anemia aplástica foram comparados grupos de pacientes tratados com GAL e metilprednisolona versus GAL, metilprednisolona e CSA, sendo os resultados nitidamente superiores no grupo que usou as 3 drogas<sup>47</sup>.

FIGURA 2 - MECANISMO DE AÇÃO DOS PRINCIPAIS IMUNOSSUPRESSORES <sup>61</sup>**Legenda:**

AZA - azatioprina

P - esteróides hormonais

CyA - Ciclosporina A

II - Interleucina

MIF - fator inibidor de migração

A tabela 5 mostra o resumo dos principais trabalhos.

Poucos estudos, até o momento, foram realizados em AA com os fatores de crescimento hematopoéticos. Tais fatores são famílias de glicoproteínas que regulam a hematopoese e têm sido clonados de células humanas, e já em amplo uso na prática clínica. A vantagem de seu uso em AA, uma vez que não há deficiência de sua produção em pacientes com AA, é que a produção e conseqüente aumento especialmente de granulócitos, permite ao paciente sobreviver um tempo longo o suficiente para responder a uma terapia específica. Estes trabalhos mostram um aumento de granulócitos, monócitos e eosinófilos, associado a um aumento da celularidade medular, em especial de células mielóides, mas não de precursores mielóides, e, por isto, esta resposta é transitória<sup>48,49,50</sup>.

O STMO do HC da UFPR, sentindo a necessidade de atender a demanda de portadores de AAS e sem condições de serem submetidos a TMO, iniciou, em 1989, um ensaio clínico utilizando a combinação de CSA e PRD. Optou-se por esta combinação em virtude do suprimento irregular de GAL, e porque os órgãos públicos não incluíam este agente nas tabelas referentes ao tratamento da AA.

TABELA 5 - RESULTADOS DOS PRINCIPAIS TRABALHOS DE IMUNOSSUPRESSÃO EM AAS

ESTUDO	ESQUEMA	N	RESPOSTA %	SOBREVIDA %	SEGUIM. (ANOS)
EGBMT	ALG +-OXI	126	33	50	1
SEATTLE	ALG + CTC	46	41	65	3
NHLBI	ALG + CTC	77	48	58	1
NIH	ALG + CSA	51	78	72	3
ALEMANHA	ALG + CSA	43	70	64	2
EGBMT	ALG + CSA + G- CSF	40	82	92	1,5

Legenda:

EGBMT: European Group of Bone Marrow Transplantation

NHLBI: National Heart, Lung, and Blood Institute

NIH: National Institute of Health

ALG: Anti-Lymphocytic Globuline

OXI: Oximetolone

CSA: Ciclosporine

G-CSF: Growth factor

## 2 OBJETIVOS

Nos 117 pacientes com AAS tratados com CSA + PRD serão analisados:

- 1- Eficácia,
- 2- Fatores que influenciam na sobrevida,
- 3- Fatores que influenciam na resposta,
- 4- Toxicidade.

Serão relatadas as características clínicas da população em estudo e as complicações apresentadas ao longo do tratamento.

### 3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

No período de junho de 1989 até fevereiro de 1996 entraram neste estudo 117 pacientes portadores de AAS. Os critérios para a definição de AAS são os estabelecidos por Camitta em 1975<sup>51</sup> (Tabela 6).

As características clínicas dos 117 pacientes estão expostas na tabela 7. Quanto à faixa etária, 45% dos pacientes tinham menos de 20 anos, sendo a maior concentração entre 10 e 20 anos (30% do total). Dois picos de incidência são observados na duração de doença, sendo o primeiro entre 60 a 120 dias e o segundo maior que 240 dias. Apenas 10% dos pacientes apresentavam a forma muito severa da doença e 60% deles tinham mais de 500 granulócitos. Finalmente, em relação à contagem inicial de plaquetas, 45% apresentavam-se com menos de 10.000/ $\mu$ L.

Todos os pacientes tinham seu diagnóstico reavaliado com punção-biópsia de medula óssea, hemograma e contagem de reticulócitos, teste de Ham e sacarose para afastar a possibilidade de Hemoglobinúria Paroxística Noturna. Todos os pacientes com menos de 18 anos eram submetidos a estudo citogenético com células mononucleares de sangue periférico sob estímulo com cisplatina e diepoxibutano para se afastar Anemia de Fanconi. Somente em 32 pacientes conseguiu-se ter estudo citogenético com bandeamento de células de medula óssea. Todos realizavam sorologia para as hepatites A e B e, nos últimos 4 anos, também para a C, além de A-HIV, Chagas e Sífilis. Além disso todos realizavam exames laboratoriais para avaliação de funções hepática e renal.

TABELA 6 - CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DA ANEMIA APLÁSTICA SEVERA

---

PANCITOPENIA COM PELO MENOS 2 DOS 3 ACHADOS SEGUINTE:

- GRANULÓCITOS	MENOR QUE 500/ $\mu$ l
- PLAQUETAS	MENOR QUE 20.000/ $\mu$ l
- RETICULÓCITOS	MENOR QUE 1%

ASSOCIADO À MEDULA ÓSSEA COM CELULARIDADE:

- MENOR QUE 25%	ACENTUADAMENTE HIPOCELULAR
- ENTRE 25 E 50%	MODERADAMENTE HIPOCELULAR COM MENOS DE 30% DE CÉLULAS HEMATOPOÉTICAS.

---

TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS INICIAIS.

Período	06/89 - 02/96
Número de pacientes	117
Sexo (M/F)	69/48 (1,4)
Idade (anos)	3 - 70 (M = 22)
Duração da doença (dias)	20 - 3903 (M = 120)
Granulócitos iniciais ( $\mu$ L)	20 - 4320 (M = 640)
Plaquetas iniciais ( $\mu$ L)	1000 - 39000 (M = 11000)
Número de transfusões prévias	0 - 160 (M = 10)
Celularidade da medula óssea	0 - 30 (M = 10)
Etiologia (%)	
Idiopática	77
Outras	23
Tratamentos prévios (%)	
Nenhum	65
Andrógeno + Corticóide	18
Corticóide	12
Ciclosporina	5

M = mediana.



De posse dos dados acima, não havendo qualquer contra-indicação ao tratamento, o paciente e no mínimo um de seus familiares, juntamente com o médico atendente, reuniam-se para esclarecer a natureza, o propósito e os efeitos colaterais do tratamento.

Todos os pacientes permaneciam em Curitiba nas primeiras 6 semanas de tratamento, em regime ambulatorial. Semanalmente, nas primeiras 6 semanas, e depois no mínimo mensalmente, eram submetidos a uma avaliação clínica e laboratorial, constando de hemograma e reticulócitos, dosagem de creatinina, magnésio, bilirrubinas, transaminases e fosfatase alcalina, além de outros exames conforme necessidade individual.

Todos os hemoderivados utilizados eram obrigatoriamente irradiados e, quando possível, filtrados. Fazia-se transfusão de concentrado de hemácias quando hemoglobina era igual ou menor do que 8,0 g/dL. Concentrado de plaquetas eram transfundidos quando a contagem de plaquetas fosse de 15000/ $\mu$ L ou menos, ou na presença de sangramento ativo.

O esquema de tratamento está detalhado na tabela 8.

A CSA utilizada foi o Sandimmun<sup>®</sup>, Sandoz, na sua apresentação de solução oral de 100 mg/mL. A partir do ano de 1996, foi substituído pela apresentação Neoral, tanto solução oral como cápsulas gelatinosas de 100, 50 e 25 mg. A escolha da solução ou de cápsulas deveu-se unicamente à tolerância do paciente. No momento da troca da solução tradicional pela Neoral, todos os pacientes realizaram dosagem sérica de ciclosporina para o ajuste da dose.

A PRD utilizada foi o Meticorten<sup>®</sup>, Schering-Plough.

Todos os pacientes receberam profilaxia anti-fúngica com nistatina ou com fluconazol, conforme a tolerância e disponibilidade. Também receberam sulfametoxazol + trimetropin (duas vezes por semana) para profilaxia de *Pneumocystis carinii*. Antibióticos de amplo espectro eram iniciados conforme decisão do médico assistente, nos episódios febris, após coleta de culturas apropriadas, e adequados após os resultados destas culturas.

Convencionou-se realizar as avaliações em 6 semanas, 3 meses, 6 meses e 12 meses do início do tratamento.

**TABELA 8 - ESQUEMA DE TRATAMENTO**

CICLOSPORINA-A	12 mg/Kg/dia (em 2 doses) nos dias + 1 a + 7; 7 mg/Kg/dia (em 2 doses) nos dias + 8 a + 84 depois o suficiente para manter nível sérico entre 200 e 400 ng/mL
PREDNISONA	2 mg/Kg/dia nos dias + 1 a + 14 1 mg/Kg/dia nos dias + 15 a + 45 retirada de 20% por semana até a suspensão completa

Os critérios de resposta padronizados são os que seguem e que são semelhantes a de outros autores:

- a) resposta completa (RC): pacientes tornaram-se assintomáticos no que relaciona-se à pancitopenia, associado a um aumento dos valores de duas linhagens, e independentes de transfusões de hemoderivados;

- b) resposta parcial (RP): melhora dos índices hematológicos mas ainda com necessidade de transfusão de hemoderivados ou com infecções que necessitassem antibioticoterapia;
- c) sem resposta (SR): sem evidências de melhora dos índices hematológicos quando comparados ao período prévio ao início do tratamento.

Os métodos de análise estatística utilizados foram o de Kaplan-Meier para a análise de sobrevida e para o tipo de resposta, e a comparação entre duas curvas foi feita através do teste de *log-rank*. Para a análise multivariada, os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com o momento da entrada no estudo, pois uma análise anterior mostrou que estes grupos eram diferentes. Serão considerados entre 1989 a 1992 e de 1993 a 1996. Para a investigação dos fatores de risco, adotou-se o modelo de Regressão Logística, onde, para a determinação do modelo estimou-se, inicialmente, o modelo composto pelos efeitos principais mais as interações das variáveis duas a duas. Após, estimou-se o modelo apenas com os efeitos principais, visando investigar a existência ou não de interações entre variáveis. Para determinação da retirada ou não das interações, adotou-se o teste da Razão de Verossimilhança. Em todos os testes realizados adotou-se o nível de significância de 5%.

FIGURA 3 - IDADE AO DIAGNÓSTICO

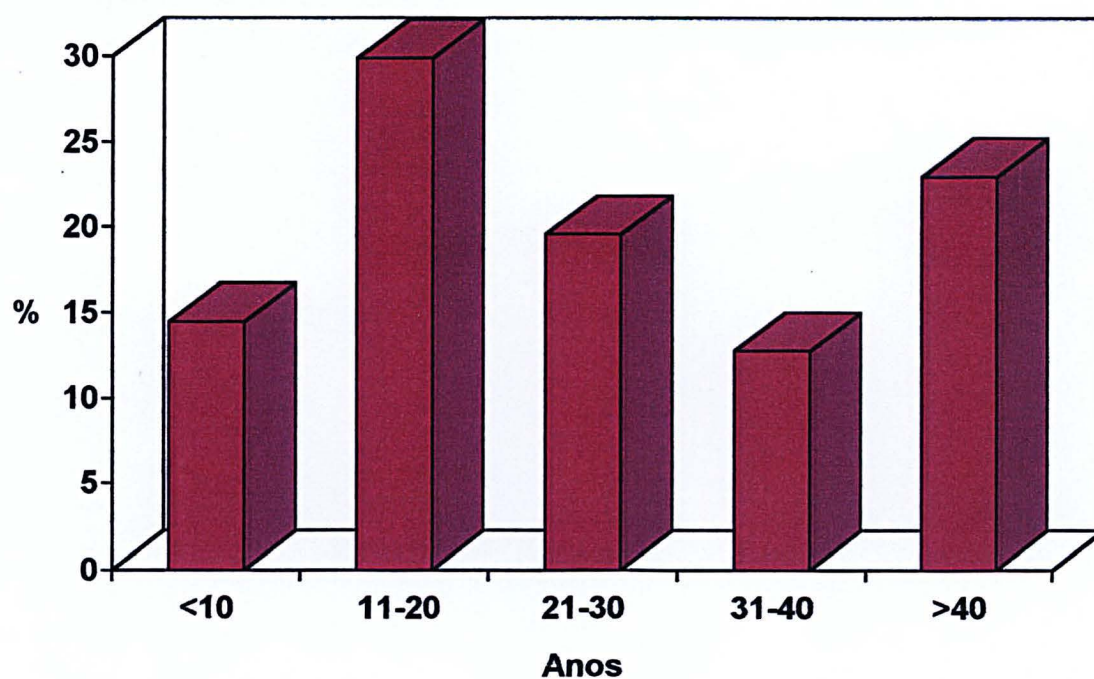


FIGURA 4 - DURAÇÃO DA DOENÇA

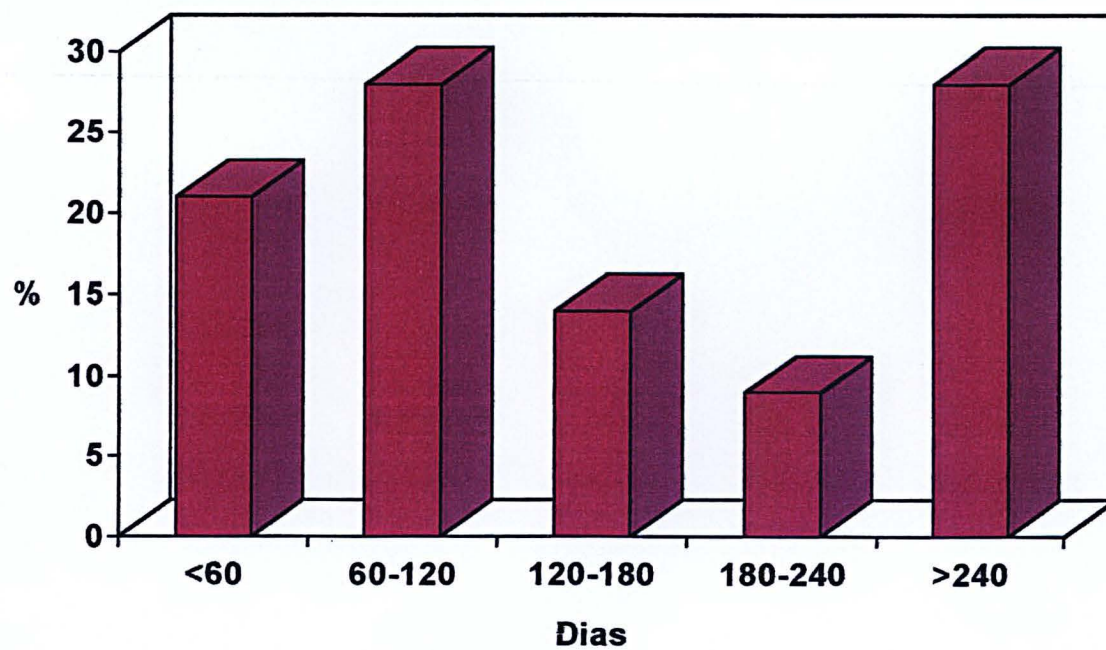


FIGURA 5 - GRANULÓCITOS AO DIAGNÓSTICO

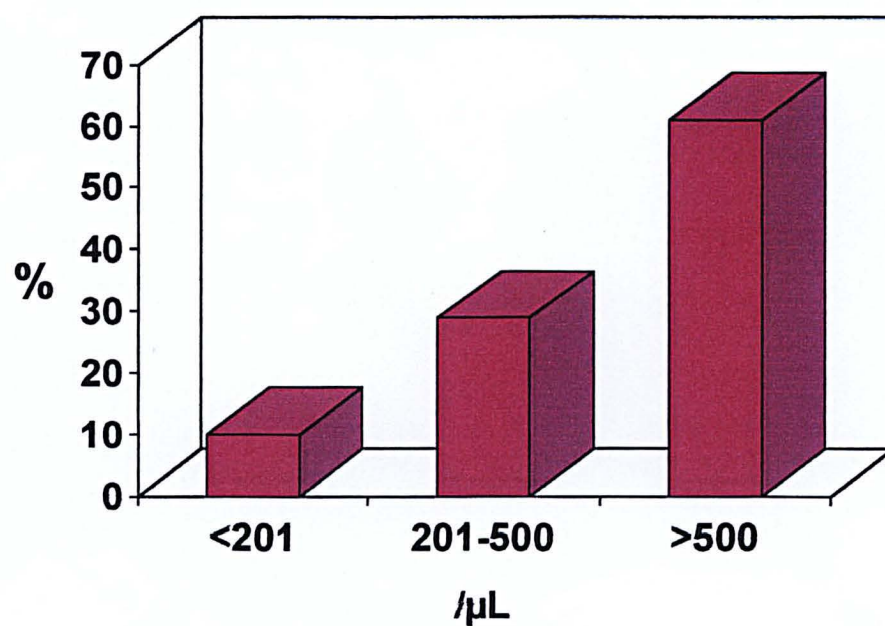
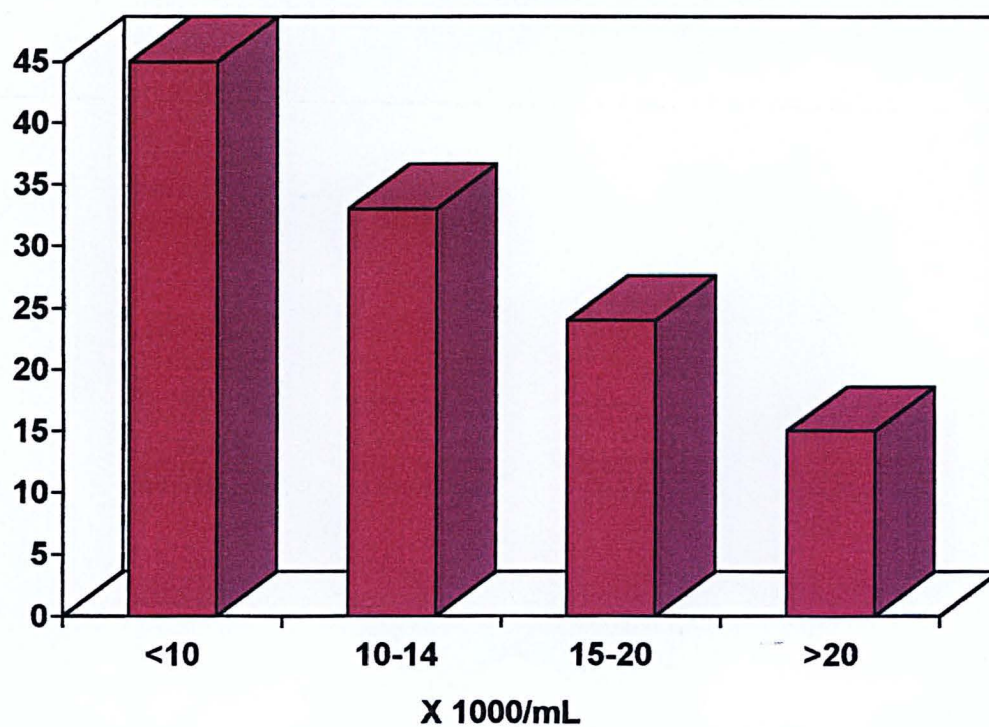


FIGURA 6 - PLAQUETAS AO DIAGNÓSTICO



## 4 RESULTADOS

A evolução dos 117 pacientes, durante o primeiro ano, está sintetizado na figura 7.

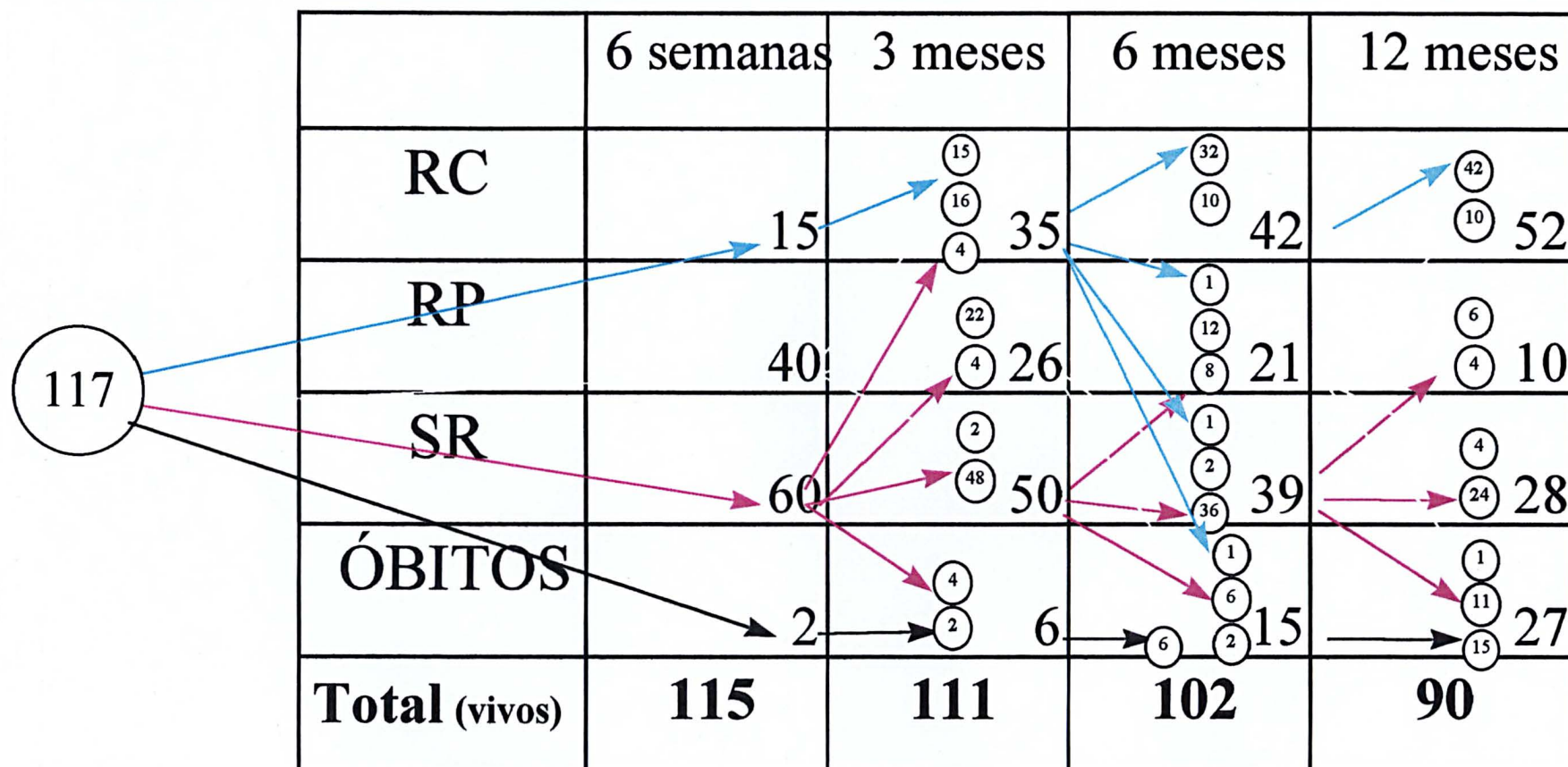
Ao final de 6 semanas 15 pacientes (13%) já tinham atingido RC; 40 (34,7%) alcançaram RP e 60 (52,1%) permaneciam SR. Dois pacientes foram à óbito antes de completarem 6 semanas de tratamento.

Na avaliação de 3 meses, 35 pacientes (31,5%) mostravam RC, sendo que 15 mantiveram-se das 6 semanas, 16 vieram da RP e 4 eram SR nas 6 semanas. Vinte e seis (23,4%) estavam com RP, dos quais 4 vieram do grupo de SR. Como SR eram 50 (45%), dos quais 2 foram recaídas de RP para NR. Neste intervalo ocorrem 4 óbitos.

Em 6 meses 42 pacientes (41,1%) estavam em RC, sendo que 10 subiram de RP para RC. Como RP eram 21 (20,5%) dos quais 8 subiram de NR. Encontravam-se 39 (38,2%) como NR, tendo havido 2 quedas de RP e 1 de RC. Nove pacientes foram à óbito neste intervalo.

Ao final de 12 meses 52 (57,7%) estavam com RC, sendo que apenas 10 subiram de RP. Como RP restavam 10, tendo 4 subido de NR. Restavam 27 SR e 12 foram à óbito neste intervalo.

FIGURA 7 - EVOLUÇÃO GLOBAL NO PRIMEIRO ANO DE SEGUIMENTO





Complicações do tratamento estão resumidas na tabela 9. Ao final de 6 semanas foram registrados 24 casos de hipertensão arterial: leve em 9, moderada em 13 e severa em 2. Três pacientes desenvolveram *diabetes mellitus*, 2 apresentaram insuficiência renal, 1 icterícia colestática e houve 1 caso de crise convulsiva tônico-clônica generalizada, não relacionada a hipomagnesimia. Nenhuma destas complicações justificou a suspensão do tratamento.

As complicações observadas na avaliação de 3 meses foram 5 casos de hipertensão arterial, leve em 3, moderada em 1 e severa em 1, 3 desenvolveram hipertrofia gengival, 2 casos de insuficiência renal, 2 casos de acne e 1 caso de polineuropatia sensitivo-motora.

Ao final de 6 meses, 4 casos novos de hipertensão arterial, 3 de hipertrofia gengival, 1 de *diabetes mellitus*, 1 de crise convulsiva e 1 paciente desenvolveu tuberculose pulmonar.

Finalmente aos 12 meses ocorreram 2 casos de necrose asséptica de cabeça de fêmur, 1 de hipertensão arterial e 1 de acidose tubular renal com hiperpotassemia severa.

Somente o caso de polineuropatia sensitivo-motora e o de acidose tubular renal justificaram a suspensão do tratamento.

Vinte e sete pacientes foram à óbito nos primeiros 12 meses da avaliação deste estudo (Figura 8). Somente 1 óbito pode ser atribuído ao tratamento imunossupressor que foi o caso de uma paciente com 67 anos que se encontrava com RC mas desenvolveu *diabetes mellitus* e faleceu aos 67 dias de tratamento por descompensação. Dois pacientes tinham atingido RP e foram à óbito por hepatite fulminante em 1 aos 102 dias e por infecção bacteriana em outro aos 215 dias.



FIGURA 8 - SOBREVIDA GLOBAL

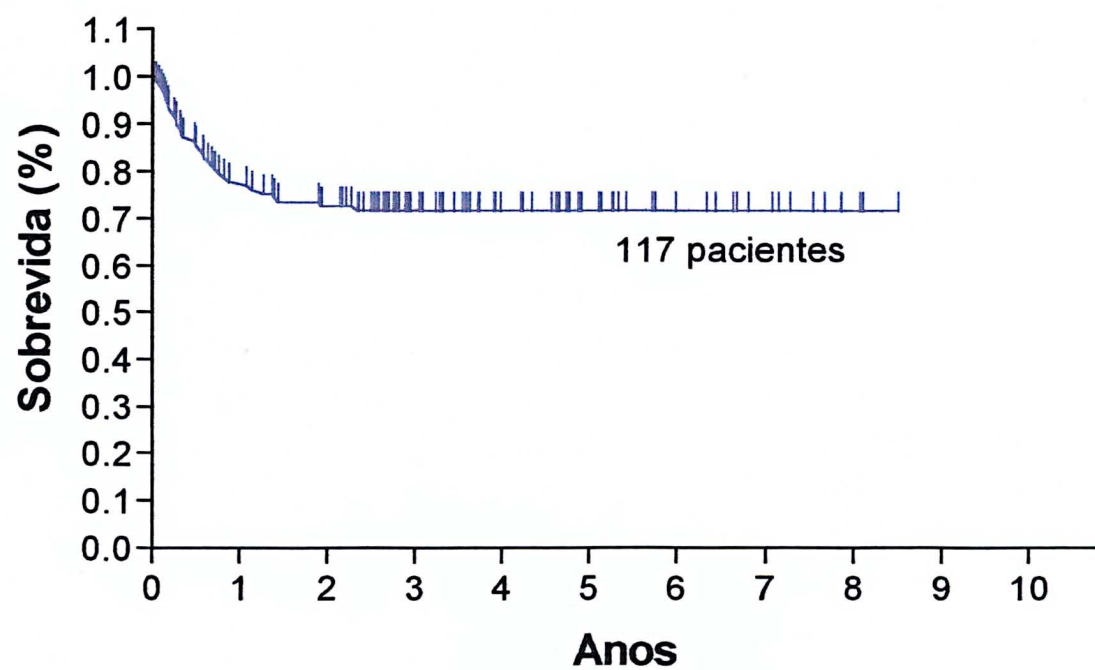
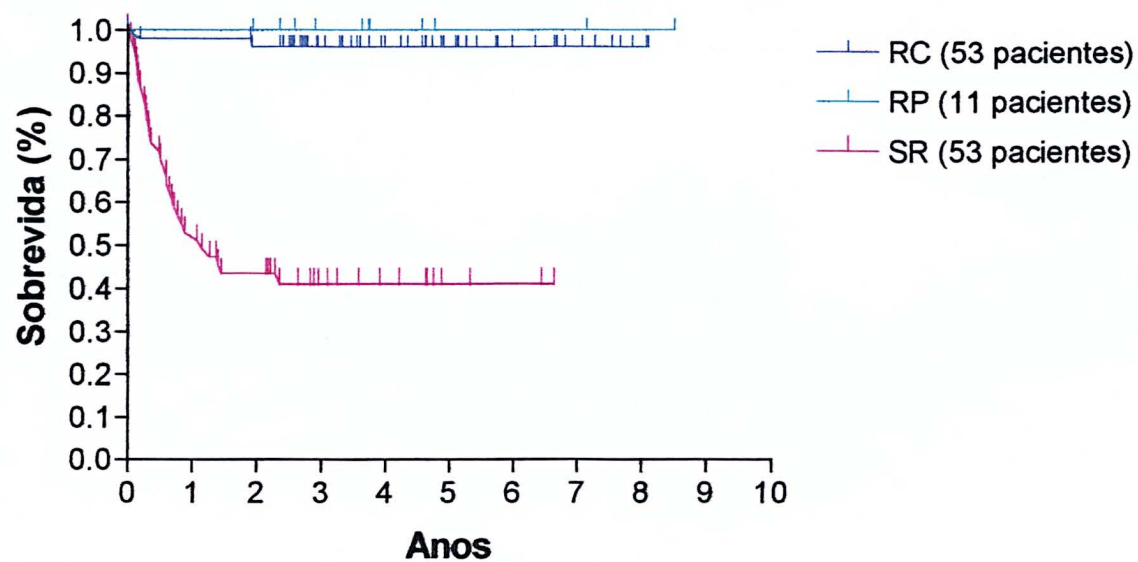


FIGURA 9 - SOBREVIDA DE ACORDO COM A RESPOSTA OBTIDA



Todos os outros casos foram pacientes que não responderam ao tratamento e as causas foram, na maioria, infecções ou hemorragias. As causas, bem como a resposta atingida e os dias dos óbitos estão resumidas na tabela 10.

**TABELA 9 - COMPLICAÇÕES DO TRATAMENTO POR ÉPOCA E NÚMERO DE PACIENTES.**

ÉPOCA	Nº PAC	COMPLICAÇÕES
ATÉ 6 SEMANAS	24	hipertensão arterial
	3	diabetes mellitus
	2	insuficiência renal
	1	icterícia colestática
	1	crise convulsiva
ATÉ 3 MESES	5	hipertensão arterial
	3	hipertrofia gengival
	2	acne
	2	insuficiência renal
	1	polineuropatia
ATÉ 6 MESES	4	hipertensão arterial
	3	hipertrofia gengival
	1	crise convulsiva
	1	diabetes mellitus
	1	tuberculose pulmonar
ATÉ 12 MESES	2	necrose asséptica da cabeça do fêmur
	1	acidose tubular renal
	1	hipertensão arterial

TABELA 10 - CAUSAS E DIAS DOS ÓBITOS E A REPOSTA OBTIDA

DIA	RESPOSTA	CAUSA
+ 17	-	hemoptise maciça
+ 31	-	hemorragia digestiva
+ 43	SR	hemorragia SNC
+ 50	SR	infarto agudo do miocárdio
+ 54	SR	hemorragia SNC
+ 59	SR	hemoptise maciça
+ 67	RC	<i>diabetes mellitus descomp.</i>
+ 94	SR	hemorragia SNC
+ 94	SR	infecção bacteriana
+ 100	SR	infecção bacteriana
+ 101	SR	infecção bacteriana
+ 102	RP	hepatite fulminante
+ 104	SR	hemoptise maciça
+ 117	SR	infecção bacteriana
+ 130	SR	hemoptise maciça
+ 185	SR	infecção bacteriana
+ 188	SR	infecção bacteriana
+ 215	SR	hemorragia SNC
+ 215	RP	infecção bacteriana
+ 217	SR	infecção bacteriana
+ 235	SR	infecção bacteriana
+ 250	SR	infecção bacteriana
+ 263	SR	hemorragia SNC
+ 281	SR	infecção bacteriana
+ 303	SR	infecção fúngica
+ 322	SR	hemorragia digestiva
+ 393	SR	infecção bacteriana

Para a análise dos fatores que interferem na sobrevida, bem como dos fatores que influenciaram o tipo de resposta obtida, os pacientes foram divididos em dois grupos chamados de respondedores (R), que é a soma dos que obtiveram RC e RP, e não-respondedores (nR).

**TABELA 11 -CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS RESPONDEDORES E NÃO-RESPONDEDORES**

	R	nR	P
Número de pacientes	64	53	-
Idade (anos)	24	21	NS
Sexo (M/F relação)	1.75	1.8	NS
Duração da doença (dias)	121	125	NS
Granulócitos iniciais / $\mu$ l	814	440	0.002
Plaquetas iniciais / $\mu$ l	14000	9000	NS
Número de transfusões iniciais	0-160 (M=9)	0-120 (M=10)	NS
Etiologia (Idiopática x outras %)	75 x 25	78 x 22	NS

Para a influência na resposta foram analisadas as variáveis idade, sexo, duração de doença, granulócitos iniciais, plaquetas iniciais, número de transfusões prévias e a etiologia da doença. A única variável que mostrou significância estatística foi a de granulócitos iniciais com  $p = 0,002$ , obviamente favorável aos que tinham número maior no início (mediana de 814 contra 440), com demonstrada na tabela 11.

Com relação à sobrevida, na análise univariada, 4 variáveis mostraram significância. São: duração de doença, com um  $p = 0,0154$  sendo superior no grupo que tinha mais de 60 dias de diagnóstico; granulócitos iniciais com um  $p = 0,0304$  favorável aos que tinham mais de 500 no início; contagem inicial de plaquetas com

$p=0,02$  favorável para o grupo com mais de  $15000/\mu\text{L}$  e, finalmente, o número de transfusões recebidas antes do início do tratamento com  $p = 0,0103$  favorável para os que tinham menos do que 15 unidades. Estas variáveis estão demonstradas nas figuras 10 a 13.

FIGURA 10 - SOBREVIDA DE ACORDO COM PLAQUETAS INICIAIS

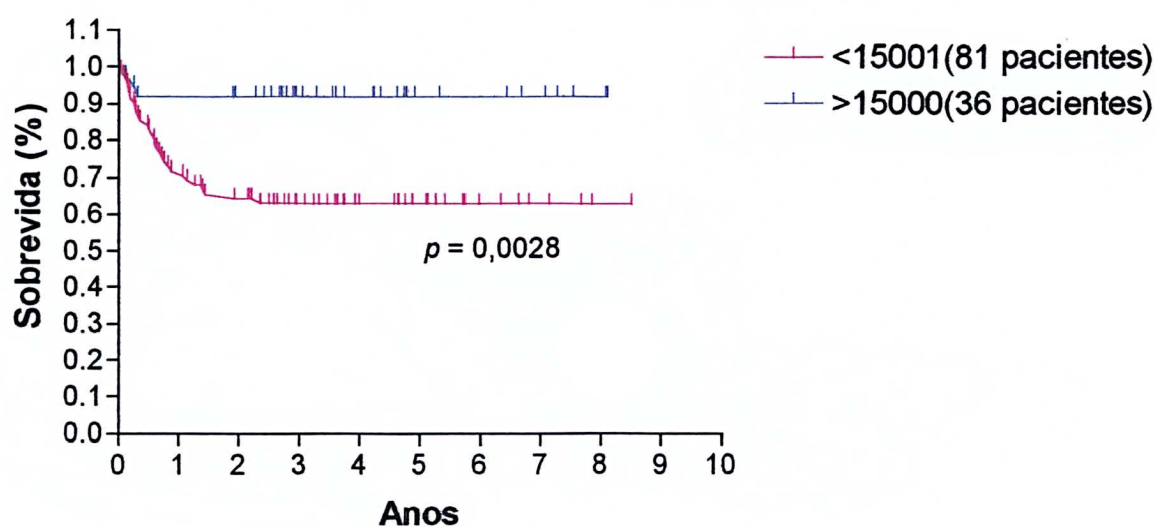


FIGURA 11 - SOBREVIDA DE ACORDO COM GRANULÓCITOS INICIAIS

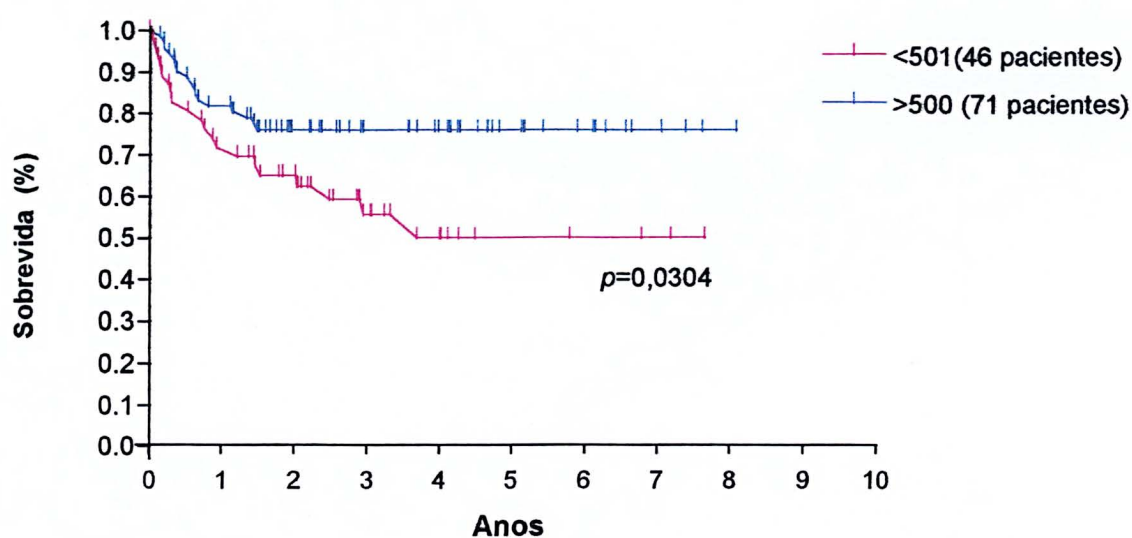


FIGURA 12 - SOBREVIDA DE ACORDO COM O NÚMERO DE TRANSFUSÕES PRÉVIAS

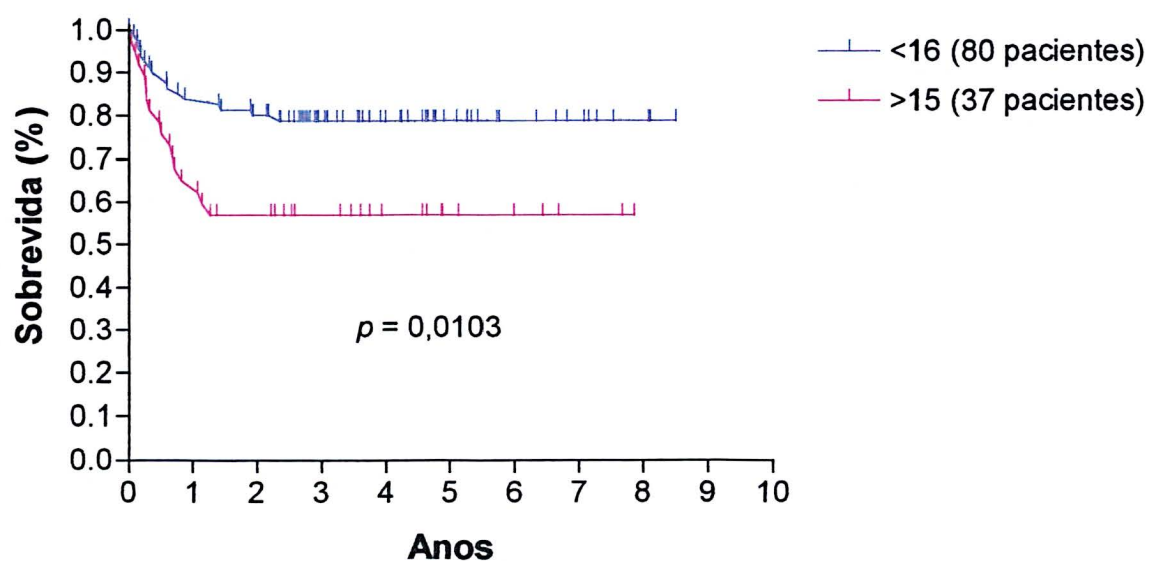
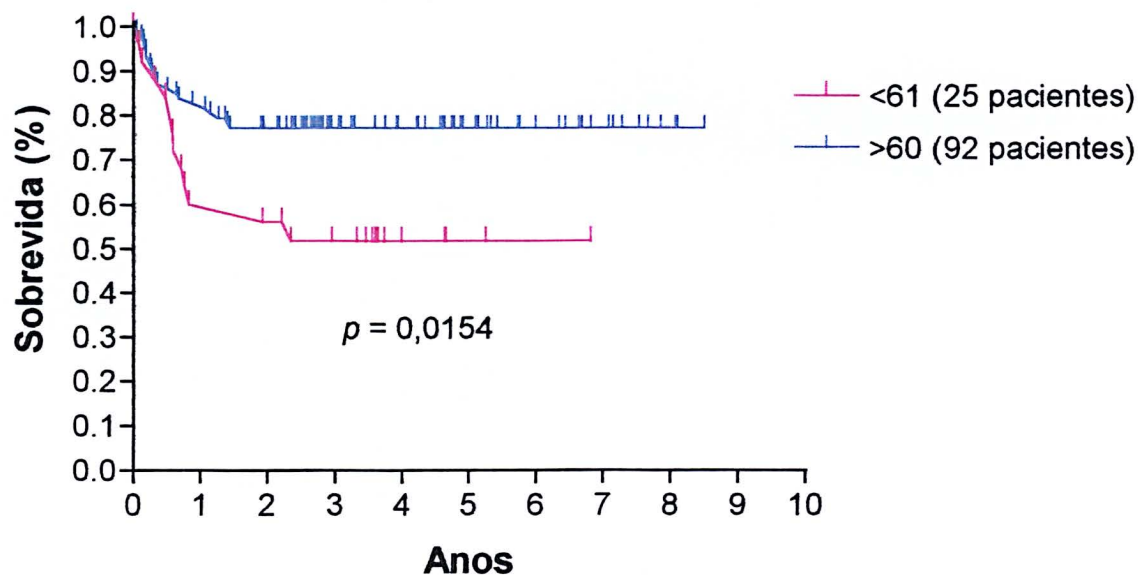


FIGURA 13 - SOBREVIDA DE ACORDO COM A DURAÇÃO DE DOENÇA

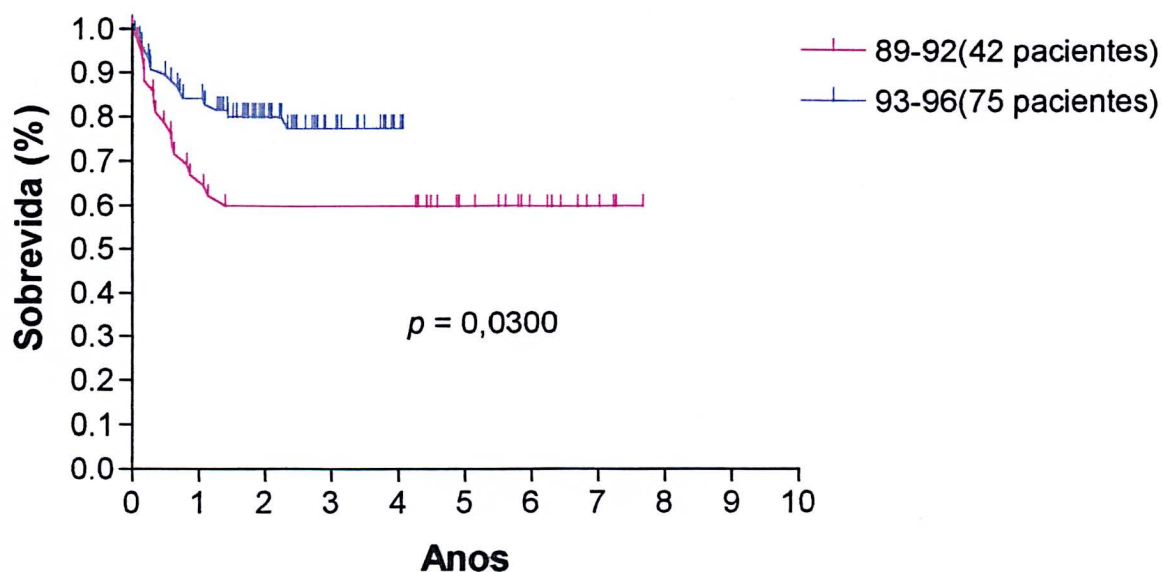


Ainda com relação à sobrevida, foi realizada análise multivariada dividindo os pacientes em dois grupos, considerando-se o período de entrada no estudo. Estes períodos são de 1989 a 1992 e de 1993 a 1996. As variáveis consideradas foram a duração de doença, o número de transfusões prévias, o número inicial de granulócitos e o número inicial de plaquetas (tabela 12)

**TABELA 12 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS POR PERÍODO DE ENTRADA**

<b>PERÍODO/CARACTERÍSTICAS</b>	<b>1989 - 1992 (N = 42)</b>	<b>1993 - 1996 (N = 75)</b>
DURAÇÃO DE DOENÇA (DIAS)	27-3903 (M = 123)	20-1851 (M=120)
Nº GRANULÓCITOS	0-4320 (M=770)	102-2760 (M=552)
TRANSFUSÕES PRÉVIAS	0-160 (M=10)	0-110 (M=9)
Nº PLAQUETAS	1000-39000 (M=11000)	1000-30000 (M=12000)

FIGURA 14 -SOBREVIDA DE ACORDO COM O PERÍODO DE ENTRADA NO ESTUDO



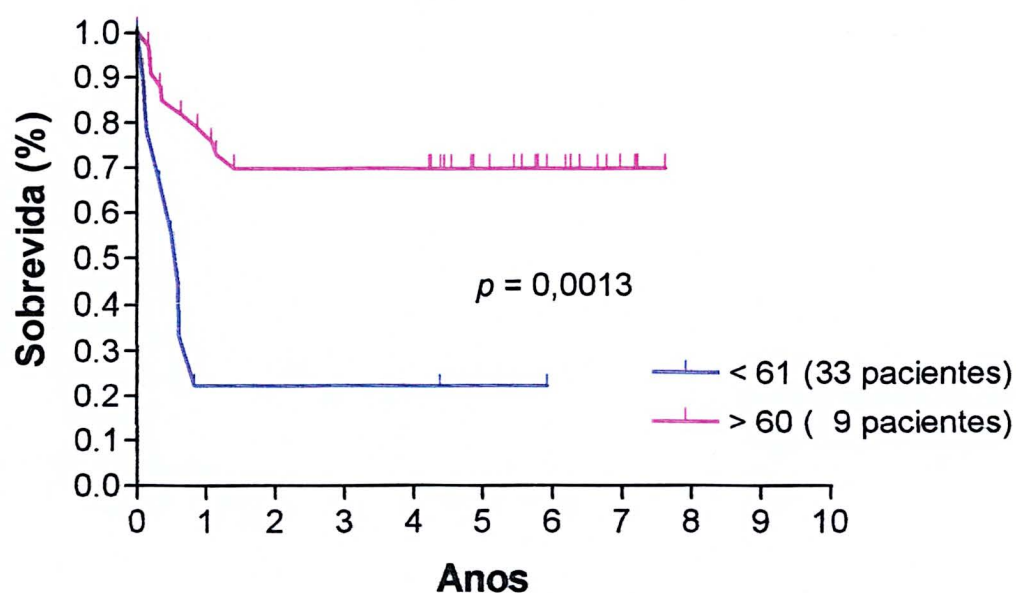
Para o período 1989-1992 foi testado, inicialmente, a hipótese nula de que os coeficientes associados às interações eram iguais a zero, versus a hipótese alternativa de que pelo menos um deles é diferente de zero. O resultado do teste de razão de verossimilhança não forneceu subsídios para rejeição da hipótese nula no nível de significância considerado ( $p=0,7843$ ). Desta forma, o modelo final ficou composto apenas dos efeitos principais. Na análise do modelo final, o único fator significativo, ao nível de significância de 5%, foi **DURAÇÃO DE DOENÇA** ( $p=0,0204$ ), favorável aos que tinham mais de 60 dias, apresentando esta variável um efeito "protetor". Os resultados das estimativas dos parâmetros juntamente com o erro padrão, as estatísticas  $t$  do teste de Wald e os valores de  $p$  associados ao teste aplicado são apresentados na tabela 13.



TABELA 13 - ANÁLISE MULTIVARIADA - PERÍODO 1989-1992

	CONST. Bo	IDADE	TEMPO	TRANSF	GRAN	PLAQ
Estimativa	.644776	.041831	-2.59382	1.358008	-.552174	-1.87888
Erro padrão	1.402937	.026724	1.06916	.867159	.918943	1.25773
<i>t</i>	.459590	1.565275	-2.42604	1.566042	-.600879	-1.49387
Valor de <i>p</i>	.648574	.126267	<b>.02040</b>	.126088	.551685	.14392

FIGURA 15 – DURAÇÃO DE DOENÇA X SOBREVIDA 1989-1992



Para o grupo de pacientes tratados entre 1993 a 1996, inicialmente testou-se a hipótese nula de que os coeficientes associados às interações eram iguais a zero, versus a hipótese alternativa de que pelo menos um deles é diferente de zero. O teste de razão de verossimilhança indicou a rejeição da hipótese nula no nível de significância considerado ( $p=0,0494$ ). A seguir investigou-se quais as interações cujos coeficientes se apresentavam significativamente diferentes de zero, quando da comparação do modelo só com os efeitos principais e o modelo com a inclusão de

cada uma das interações individualmente. Como resultado desta investigação encontrou-se como significativos os coeficientes associados às interações **IDADE X NÚMERO DE TRANSFUSÕES** e **IDADE X CONTAGEM DE PLAQUETAS**. Para estabelecer o modelo final comparou-se o modelo completo (incluindo todos os efeitos principais e as interações duas a duas) com o modelo incluindo os efeitos e mais as interações que se apresentaram significativas. Como resultado aceitou-se a hipótese nula correspondente a que todos os outros coeficientes associados às outras interações eram iguais a zero ( $p=0,4537$ ). Desta forma, o modelo final ficou composto pelos efeitos principais e as interações **IDADE X NÚMERO DE TRANSFUSÕES** e **IDADE X NÚMERO DE PLAQUETAS**. Na análise do modelo final, considerando-se o Teste de Wald, o fator **NÚMERO DE TRANSFUSÕES** apresentou-se significativo, ao nível de significância de 5% ( $p=0,011988$ ), sendo o mesmo um fator de risco para o óbito do paciente. O fator **CONTAGEM DE PLAQUETAS** apresentou uma tendência a significância ( $p=0,06797$ ), apresentando esta variável um efeito "protetor". Encontrou-se como tendo tendência a significância as interações entre **IDADE X NÚMERO DE TRANSFUSÕES** ( $p=0,07262$ ) e **IDADE X CONTAGEM DE PLAQUETAS** ( $p=0,057177$ ). Para interpretar o significado desta interações, são apresentados nas tabelas abaixo as idades médias para o cruzamento entre a **SITUAÇÃO DO PACIENTE** e **NÚMERO DE TRANSFUSÕES** e o cruzamento entre **SITUAÇÃO DO PACIENTE** e **CONTAGEM DE PLAQUETAS**.

TABELA 14 - IDADE X TRANSFUSÕES PRÉVIAS - 1993-1996.

Nº DE TRANSFUSÕES PRÉVIAS		
	<16	>=16
	IDADE MÉDIA	
VIVO	25,02 (n= 44)	28,27 (n= 15)
MORTO	30,14 (n= 7)	17,44 (n= 9)

TABELA 15 - IDADE X CONTAGEM DE PLAQUETAS - 1993-1996

CONTAGEM DE PLAQUETAS		
Nº DE PLAQUETAS	<15001	>=15001
VIVO	25,18 (n= 34)	26,76 (n= 25)
MORTO	18,93 (n= 14)	51,50 (n= 2)

Os resultados das estimativas dos parâmetros juntamente com o erro padrão, as estatísticas  $t$  do Teste de Wald e os valores de  $p$  associados ao teste aplicado são apresentados na tabela 16.

TABELA 16 - ANÁLISE MULTIVARIADA - 1993-1996.

	Const.BO	IDADE	TEMPO	TRANS.	GRAN.	PLAQ.	IDADE X TRANSF	IDADE X PLAQ
Estimativa	-.589484	.000846	-1.17020	3.834458	-.85857	-6.38388	-.08670	.143196
Erro padrão	1.018963	.032500	.83932	1.484572	.73589	3.44115	.04753	.073992
t	-.578513	.026027	-1.39423	2.582871	-1.16671	-1.85516	-1.82395	1.935286
Valor de p	.564857	.979313	.16786	.011988	.24746	.06797	.07262	.057177

Para interpretação do sinal das estimativas dos parâmetros das interações considere-se, por exemplo, o parâmetro da interação IDADE X PLAQUETAS, o qual é positivo. Observando a tabela dos cruzamentos de SITUAÇÃO DO PACIENTE e CONTAGEM DE PLAQUETAS, pode-se perceber que entre os pacientes com contagem de plaquetas  $\geq 15001$ , a idade média entre os mortos é maior que entre os vivos, ocorrendo o efeito contrário entre os pacientes com contagem de plaquetas  $< 15001$ .

No momento em que este trabalho foi analisado, o tempo de uso da ciclosporina variava de 410 a 1200 dias no grupo de respondedores. Aqueles pacientes que não obtiveram resposta e continuavam vivos ao final de 1 ano, passaram a fazer outro tratamento, sendo que 6 foram a transplante de medula, 15 receberam globulina antilinfocítica com ou sem fatores de crescimento, 4 receberam oximetolona e 3 nenhum outro tratamento.

Ainda, no momento desta análise, 8 pacientes do grupo de respondedores apresentaram recaída. Nestas recaídas estão 6 mulheres sendo que em 2 a recaída foi durante uma gestação, e em outra foi no início da menarca. Todas apresentaram resposta a um novo tratamento com este mesmo esquema. Dois homens apenas apresentaram recaída, um dos quais havia retomado suas atividades profissionais que envolviam o manuseio de produtos químicos. Estes dois pacientes foram a óbito por hemorragia logo no início do segundo tratamento, portanto sem tempo suficiente para apresentarem nova resposta. Todas as recaídas, com exceção da última, ocorreram após a suspensão completa da ciclosporina, e foram num período

que variou de 410 a 1780 dias após o início do tratamento com uma mediana de 880 dias.

## 5 DISCUSSÃO

O diagnóstico de AAS impõe medidas terapêuticas imediatas, pois, a depender da intensidade da pancitopenia, complicações fatais poderão ocorrer.

Seguramente o transplante de medula óssea é o procedimento mais eficaz em reconstituir a hematopoese normal, mas infelizmente não é aplicável a todos os pacientes, restando o tratamento *imunossupressor como alternativa*.

A necessidade de atender os pacientes encaminhados ao Serviço de Transplante mas sem condições de submeterem-se ao procedimento, levou a criação deste protocolo de imunossupressão.

Desde sua criação o Serviço de Transplante tornou-se referência para o tratamento de pacientes com anemia aplástica e, recebendo pacientes de todo o Brasil, tornou-se um dos serviços de maior expressão nesta doença. Até fevereiro de 1997, mais de 670 pacientes haviam sido referendados e 504 foram submetidos a alguma modalidade de tratamento. Esta série de 117 pacientes, considerando-se como instituição única e num mesmo esquema de tratamento, é uma das maiores encontradas na literatura.

As características clínicas de nossa casuística assemelham-se aos outros estudos no que se refere à etiologia da doença e na idade mediana dos pacientes, mas difere quanto ao tempo decorrido entre o diagnóstico e o início do tratamento, à sua gravidade e ao número de transfusões recebidas<sup>5,6,29,38</sup>. Nestes pacientes o tempo de doença é maior, bem como o número de transfusões recebidas e, por outro lado, a gravidade da doença é menor. Estas características podem ser explicadas pela demora no encaminhamento dos doentes, especialmente nos anos

anteriores a 1995, quando se passou a fazer uma maior divulgação das peculiaridades desta doença, e, também as melhorias implantadas em nosso Serviço. Ainda, na demora para o início do tratamento, não se pode esquecer os obstáculos naturais gerados pelos enormes problemas sócio-econômicos da grande maioria de nossos doentes.

Os resultados deste estudo mostram que ao final de 12 meses, dos 117 pacientes que entraram nos estudo, 90 (77%) estavam vivos. Dos 90 vivos, 52 com RC, 10 com RP e 28 SR. Dentre aqueles com RC, observa-se que 15 já atingiram nas 6 primeiras semanas, que é um pouco precoce quando comparados a outras séries<sup>5,6,42,47,55</sup>, e que a maioria das respostas ocorre aos 3 meses, sendo rara após os 6 meses. Esta observação permite afirmar que, não ocorrendo resposta em até 6 meses, outra modalidade de tratamento deve ser instituída. Nesta série, devido à definição do protocolo original, uma segunda modalidade de tratamento só foi instituída aos 12 meses e foram em 25 pacientes considerados como SR, sendo que 15 receberam globulina anti-linfocítica, 6 foram a TMO e 4 receberam oximetolona. Do grupo de RC, 8 apresentaram recaída da aplasia, numa mediana de tempo de 880 dias após o início do tratamento, e conseguiu-se resgatar 6 deles com o mesmo protocolo. Ainda, o grupo de respondedores (RC e RP) tem sido avaliado periodicamente para alterações clonais ou displásicas. Dispomos, em nosso meio, apenas de estudo citogenético com bandeamento e teste de Ham e sacarose, além de análise morfológica de medula óssea. Até o momento não há evidência de tais alterações, mas é uma preocupação devido às publicações na literatura<sup>43,52,53,54,59</sup>.

Nesta casuística, o único fator que influenciou a resposta obtida ao tratamento foi o número de granulócitos iniciais. A mediana de granulócitos, de 640, é maior do

que em outras séries. Mais uma vez pode-se explicar pela demora no encaminhamento pois, provavelmente, os pacientes com a forma mais grave da doença morrem antes de poderem iniciar um tratamento.

Algumas séries demonstram uma melhor resposta em pacientes com mais de 20 anos de idade<sup>4,6,60</sup>, o que não foi demonstrado nesta série, mesmo sendo a mediana de idade semelhante às das séries mencionadas.

Para a sobrevida, foram estatisticamente significantes, na análise univariada, o tempo de duração de doença (maior que 60 dias), o número de granulócitos iniciais (maior que 500/ $\mu$ L) e o número de transfusões prévias (menor que 15 unidades), determinando uma melhor sobrevida. Estas características são típicas de pacientes com a forma não severa da doença, reforçando, mais uma vez, a necessidade de um tratamento precoce. A influência do número de granulócitos na sobrevida é bastante demonstrada na literatura<sup>39,42,55,56,57</sup> sendo, na maioria, o corte em 200 granulócitos. A análise multivariada dos efeitos que interferem na sobrevida foram divididas em dois períodos pois uma análise anterior mostrou que há diferença entre os tratados antes e depois de 1993. Para os pacientes do primeiro grupo (1989 a 1992) só o tempo de duração de doença mostrou-se com significância estatística ( $p=0,02040$ ), enquanto que no segundo grupo (1993 a 1996), mostraram uma tendência à significância, o número de plaquetas ao diagnóstico ( $p=0,06797$ ), o número de transfusões no momento do início do tratamento ( $p=0,011988$ ), bem como a idade relacionada ao número de plaquetas, sendo favorável aos que apresentavam menor idade e mais que 15000 plaquetas ( $p=0.057177$ ).

Os efeitos colaterais do esquema de tratamento observados nesta série foram, na maioria, controlados. Apenas um óbito pode ser atribuído ao tratamento,



que foi o caso de *Diabetes Mellitus* descompensado, sem controle apesar das medidas instituídas. Outros dois efeitos colaterais, apenas, justificaram a suspensão do tratamento. Um deles, polineuropatia sensitivo-motora grave tornava o paciente incapacitado para as atividades simples diárias. O outro foi acidose tubular renal, com hiperpotassemia severa e risco de vida, requerendo cuidados de UTI. O mais comum dos efeitos colaterais observados foi hipertensão arterial, já ocorrendo, na maioria dos casos, nas primeiras 6 semanas, e controlados com medidas como dieta hipossódica, diuréticos, inibidores do sistema renina-angiotensina e, raramente, bloqueadores do canal de cálcio. Outros efeitos colaterais freqüentemente descritos<sup>4,47,55,58</sup>, foram menos observados, e nenhum justificou a suspensão do tratamento. Hipertriglicose, apesar de ser a queixa mais comum das pacientes femininas, não foi valorizada nesta série. Com a finalização do tratamento houve regressão completa ou parcial destes efeitos, exceção óbvia aos dois casos de necrose asséptica de cabeça de fêmur, que necessitaram de cirurgia para colocação de prótese.

Quanto aos óbitos desta série, somente 1 ocorreu em paciente com RC, que é o caso do *diabetes mellitus* já comentado. Dois pacientes com RP foram à óbito, sendo um por hepatite fulminante e outro por infecção bacteriana. Ambos encontravam-se ausentes de Curitiba na ocasião do óbito e, talvez, não tenham recebido o devido suporte. Todos os outros 24 eram SR, e em alguns destes, tenha sido por infecção ou hemorragia a causa do óbito, pode ter havido falha no tratamento de suporte, mesmo em nosso Serviço, especialmente nos primeiros anos deste trabalho. Nos últimos 4 anos, depois das melhorias implantadas no Serviço e nos serviços de apoio, os óbitos podem ser atribuídos à refratariedade à transfusões

de plaquetas e, de outro lado, a neutropenia prolongada levando, como é de se esperar, a infecções bacterianas e fúngica. Por último, o baixíssimo número de infecções fúngicas documentadas, somente 1 caso, pode ser atribuído à profilaxia contínua com agentes anti-fúngicos e a falta de métodos laboratoriais mais sensíveis para seu diagnóstico e, por fim, a não realização de autópsias.

## 6 CONCLUSÕES

A análise desta casuística permite as seguintes conclusões:

- 1) A combinação de ciclosporina e prednisona para o tratamento da AAS é perfeitamente viável em nosso meio.
- 2) A toxicidade do esquema é tolerável, sendo a grande maioria das complicações facilmente controláveis.
- 3) A maioria das resposta ocorre entre os 3 e 6 meses do tratamento, sendo excepcional sua ocorrência após os 6 meses. Impõem-se assim a necessidade de um grande esquema de suporte para que os pacientes tenham a oportunidade de chegar aos 6 meses e terem a resposta.
- 4) Não houve diferença no tipo de resposta quando analisado a idade do paciente.
- 5) O número inicial de granulócitos é o único fator encontrado que influencia o tipo de resposta obtida.
- 6) A sobrevida é influenciada pela duração da doença, pelo número de transfusões prévias, pelo número de plaquetas iniciais e, também, pelo número de granulócitos.
- 7) Recaídas podem ocorrer após a suspensão do tratamento mas pode-se ter uma nova resposta com o mesmo esquema de tratamento.
- 8) Apesar do tempo de acompanhamento ser relativamente curto, não houve casos de doença clonal hematológica.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 YOUNG, N. S; ALTER, B.P. **Aplastic Anemia Acquired and Inherited.**  
Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994, pp 4-6.
- 2 MEDEIROS, C.R. **Tratamento da Anemia Aplástica Severa Adquirida com Globulina Antitimocítica.** Análise de 21 pacientes. Dissertação apresentada para conclusão de Mestrado em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1987, pp 2-7.
- 3 WILLIAMS, D.M.; LYNCH, RS; CARTWRIGHT, G.E. Drug induced aplastic anemia. **Semi. Hematol.**, 10:195-223, 1973.
- 4 BACIGALUPO, A.; HOWS, J.; GLUCKMAN, E. Bone marrow transplantantion versus immunossupression for the treatment of severe aplastic anemia. **Br J Hematol**, 70:177, 1988
- 5 JACOBS, P; WOOD, L; MARTEL, R.M. Cyclosporin A in the treatment of severe aplastic anemia. **Br J Hematol**, 61:267, 1985
- 6 GLUCKMAN, E; ESPERON, H; DEVERGIE, A. Comparison of cyclosporin A and horse antithymocyte globulin for the treatment of severe aplastic anemia: A multicenter prospective randomized study. **Blood** 72(suppl 1):42a, 1988
- 7 BRIDGES, R; PINEO,G; BLAKEY,W. Cyclosporin A for the treatment of aplastic anemia refractory to antithymocyte globulin. **Am J Hematol** 26:83, 1987
- 8 KAUFMAN D.W; KELLY J.P; LEVY M; SHAPIRO S. **The Drug Etiology of Agranulocytosis and Aplastic Anemia.** New York, Oxford University Press, 1991, pp 159-169.

- 9 ISSARAGRISIL, S; KAUFMAN, D. W; ANDERSON, T. E; CHANSUNG, K;  
THAMPRASIT, T; SIRIJIRACHAI, J; PIANKIJAGUM, A; PORAPAKAM, Y;  
VANNASAENG, S; LEAVERTON, P. E; SHAPIRO, S; YOUNG, N. S; and  
the Aplastic Anemia Study Group. **An Association of Aplastic Anemia in  
Thailand with Low Socioeconomic Status**
- 10 YOUNG, N. S; ALTER, B.P. **Aplastic Anemia Acquired and Inherited.**  
Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994, pp 3-11.
- 11 KAUFMAN D.W; KELLY J.P; LEVY M; SHAPIRO S. **The Drug Etiology of  
Agranulocytosis and Aplastic Anemia.** New York, Oxford University Press,  
1991, pp 37-53.
- 12 BAVERSTOCK, K.F; ASH, P.J. A review of radiation accidents involving whole  
body exposure and the relevance to LD <sub>50/60</sub> for man. **Br J Radiol** 56:837-  
849, 1983.
- 13 BOTTIGER, L.E.; WESTTERHOLM, B. Aplastic Anemia and infectious hepatitis.  
**Acta Med Scand.**, 192:323-326, 1972.
- 14 ZELDIS, J.B; DEINSTAG, J.L; GALE, R.P. Aplastic anemia and non-A, non-B  
hepatitis. **Am J Med.**, 74:64-8, 1983
- 15 MARY, J.Y; BAUMELOU, E; GUIGUET, M. Epidemiology of aplastic anemia in  
France. **Blood** 75:1646-1653, 1990.
- 16 HAGLER, L; PASTORE, R.A; BERGIN, J.J; WRENSCH, M.R. Aplastic anemia  
following viral hepatitis: Report of two fatal cases and literature review.  
**Medicine** 54:139-164, 1975.
- 17 BROWN, K. E; TISDALE, J; BARRETT, J; DUNBAR, C. E; YOUNG, N. S.  
Hepatitis-Associated Aplastic Anemia. **N Engl J Med** 336:1059-1064, 1997.

- 18 Case records of the Masschussets General Hospital: Case 31-1984. **N Engl J Med** 311:314-22, 1984.
- 19 YOUNG, N. S; ALTER, B.P. IN: **Aplastic Anemia Acquired and Inherited**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994, pag 12
- 20 KAUFMAN D.W; KELLY J.P; LEVY M; SHAPIRO S. **The Drug Etiology of Agranulocytosis and Aplastic Anemia**. New York, Oxford University Press, 1991, pp 278-286.
- 21 YUNIS,A.A. Chloranfenicol toxicity: 25 years of research. **Am J Med** 87:3-44N-3-48N, 1989.
- 22 NISSEN-DRUEY, C. Pathophysiology of Aplastic Anemia. **Blood Reviews**. 4:97-102, 1990.
- 23 BACIGALUPO, A.; PODESTA, M.; RAFFO, M.R. Lach of in vitro colony (CFU) formation and myelossuppressive activity in patients with severe aplastic anemia after autologous reconstitution. **Exp Hematol.**, 8/6: 795-801, 1980
- 24 YOUNG, N.S; MACIEJEWSKI, J; The pathophysiology of Acquired Aplastic Anemia. **N Engl J Med**, 336:1365-1372, 1997
- 25 CALLERA, F; GARCIA, A,B; FALCÃO, R,P.: Increased apoptotic cells in bone marrow biopsies from patients with aplastic anemia. **British Journal of Haematology**. 1997,98,18-20.
- 26 MELLO, M, F; **Associação entre HLA-DR2 e anemia aplástica**. Monografia apresentada para obtenção de título de Especialista no Curso de Especialização em Imunologia, Setor de Ciências da Saúde, UFPr, 1996, pp 35-36.

- 27 NISSEN, C; CORNU, P; GRATWHOL, A; SPECK, B. Peripheral blood cells from patients with aplastic anemia in partial remission suppress growth of their own bone marrow precursors in culture. **Br J Hematol.**, 45:233-243, 1980.
- 28 YOUNG, N. S; ALTER, B.P. **Aplastic Anemia Acquired and Inherited.** Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994, pp 3-11.
- 29 PASQUINI, R. **Transplante de medula óssea na anemia aplástica severa.** Tese apresentada para Concurso de Professor Titular do Departamento de Clínica Médica do Setor de Ciências da Saúde da UFPR. Curitiba, 1991, pp 10-12.
- 30 CHAMPLIM, R.; HO, W.; GALE, R.P. Antithymocyte globulin treatment in patients with aplastic anemia: a prospective randomized trial. **N Engl J Med.**, 308:113-118, 1983
- 31 OSGOOD, E. E.; RIDDLE, M.C.; MATHEUS, T.J. Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow. **Ann Intern Med.**, 13:357-367, 1939.
- 32 THOMAS, E. D. ; BUCKNER, C.D.; STORB, R.; NEIMAN, P. E.; FEFER, A.; CLIFT, R. A.; SLICHTER, S. J.; FUNK, D.D.; BRYANT, J.I.; LERNER, K. E. Aplastic anemia treated by bone marrow transplantation. **Lancet.**, 284-289, 1972.
- 33 GLUCKMAN, E.; HOROWITZ, M.M.; CHAMPLIM, R.E.; HOWS, J.M.; BACIGALUPO, A.; BIGGS, J.C.; CAMITTA, B.M.; GALE, R.P.; GORDON-SMITH, E.C.; MARMONT, A.M.; MASAOKA, T.; RAMSAY, N. K. C.; RIMM, A.A.; ROZMAN, C.; SOBOCINSKI, K.A.; SPECK, B.; BORTIM, M.M. Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: influence of

conditioning and graft-versus-host-disease prophylaxis regimens on outcome.

**Blood**, 1991.

- 34 PASQUINI, R. **Transplante de medula óssea na anemia aplástica severa.**

Tese apresentada para Concurso de Professor Titular do Departamento de Clínica Médica do Setor de Ciências da Saúde da UFPR. Curitiba, 1991, pp 106-108.

- 35 PASQUINI, R.; BITENCOURT, M.A.; MEDEIROS, C.R.; ZANIS-NETO, J.; ANDRADE, R.J.; OGASAWARA, V.S.; FRIEDRICH, M.L.; BONFIM, C.M. Cyclophosphamide plus Busulfan in preparation for allogeneic bone marrow transplantation in patients with severe aplastic anemia and high risk of graft rejection. **38th Annual Meeting of the American Society of Hematology.** Orlando, Florida USA. Dezembro de 1996.

- 36 GARDNER, F. H. Androgen therapy in aplastic anemia. **Clin Hematol.**, 7:571-85, 1978.

- 37 BACIGALUPO, A.; GIORDANO, D.; VAN LINT, M. T.; VIRMECATI, R.; MARMONT, A. M. Bolus methyl-prednisolone in severe aplastic anemia. **N Engl J Med.**, 300:501, 1979.

- 38 MATHE, G.; AMIEL, J. L.; SCHWARZENBERG, L.; SCHNEIDER, M.; CHOAY, J.; THOLARD, P.; HAYAT, M.; SCHULEMBERG, J. R.; JASMIC, C. Bone marrow graft in man after conditioning by antithymocyte globulin. **Br J Med.**, 2:131, 1970.

- 39 GLUCKMAN, E.; DEVERIGIE, A.; FAILLE, A.; BARRET, A. L.; BONNEAU, M.; BOIRON, M.; BERNARD, J. Treatment of severe aplastic anemia with antilymphocyte globulin and androgens. **Exp Hematol.**, 6:679-687, 1978.



- 40 RAEFSKY, E.; GASCON, P.; GRATWOHL, A.; SPECK, B.; YOUNG, N. S.  
Biological and biochemical characterization of anti-thymocyte globulins (GAT)  
and antilymphocyte globulins (GAL). **Blood**, 68:712-719, 1986.
- 41 KAWANO, Y.; NISSEN, C.; GRATWHOL, A.; SPECK, B. Immunoestimulatory  
effects of different antilymphocyte globulin preparations: a possible clue to  
their clinical effect. **Br J Haematol.**, 68:115-119, 1988.
- 42 MEDEIROS, C.R. **Tratamento da Anemia Aplástica Severa Adquirida com  
Globulina Antitimocítica.** Análise de 21 pacientes. Dissertação apresentada  
para conclusão de Mestrado em Medicina Interna da Universidade Federal do  
Paraná. Curitiba, 1987, pp 71-72.
- 43 MEDEIROS, C. R.; ZANIS NETO, J.; ANDRADE, R. J.; OGASAWARA, V. S.;  
BITENCOURT, M. A.; FRIEDRICH, V. L. K.; BONFIM, C. M. S.; RIBEIRO, R.  
C.; PASQUINI, R. Clinical outcome of young patients with severe acquired  
aplastic anemia treated with antithymocyte globulin. **Blood**, vol 86, 10:suppl  
1, 1995.
- 44 STRYCKMANS, P. A.; DUMONT, J. P.; VELU, T.; DEBUSSCHER, L.  
Cyclosporine in refractory severe aplastic anemia. **N Engl J Med.**, 310:655-  
656, 1984.
- 45 ESPEROU, H.; DEVERGIE, A.; LEHN, P.; LALLEMAND, A.; GLUCKMAN, E.  
A randomized study comparing cyclosporin A and antithymocyte globulin for  
treatment of severe aplastic anemia. **Nouv Rev Fr Haematol.**, 31:65-68,  
1989.
- 46 WENGER, R. M. Pharmacology of cyclosporin - Chemistry. **Pharm. Reviews.**  
3:243-247, 1989.

- 47 FRICKHOFEN, N.; HEIT, W.; RAGHAVACHAR, A.; PORSOLT, F.; HEIMPEL, H. Treatment of aplastic anemia with cyclosporin-A, methylprednisolone, and antithymocyte globulin. **Klin Wochenschr.** , 64:1165-1170, 1986.
- 48 CHAMPLIN, R. E.; NIMER, S. D.; IRELAND, P.; GOLDE, D. W. Treatment of refractory aplastic anemia with recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. **Blood.**, 73:694-699, 1989.
- 49 VANDHAN-RAJ, S.; BUESCHER, S.; LEMAISTRE, A.; KEATING, M.; WALTERS, R.; VENTURA, C.; HITTELMAN, W.; BROXMEYER, H. E.; GUTTERMAN, J. U. Stimulation of hematopoiesis in patients with bone marrow failure and in patients with malignancy by recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. **Blood.**, 72:134-141, 1988.
- 50 ANTIN, A. J.; SMITH, B. R.; HOLMES, W.; ROSENTHAL, D. S. Phase I/II study of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. **Blood.**, 72:705-713, 1988.
- 51 CAMITTA, B. M.; THOMAS, E. D.; NATHAN, D. G. A prospective study of androgens and bone marrow transplantation for treatment of severe aplastic anemia. **Blood.**, 53:504-514, 1979.
- 52 YAMAGUCHI, M; NAKAO, S; TAKAMITSU, H; CHUHJO, T; SHIOBARA, S; MATSUDA, T. Quality of hematologic recovery in patients with aplastic anemia following cyclosporine therapy. **Exp Hematol.**23:341-346, 1995.
- 53 TICHELLI, A; GRATWOHL, A; WÜRSCH, A; NISSEN, C; SPECK, B. Late haematological complications in severe aplastic anemia. **Br J Hematol.** 69:413-418, 1988.

- 54 de PLANQUE, M, M; KLUIN-NELEMANS, C, H; van KRIEKEN, H, J, M; KLUIN, P, M; BRAND, A; BRVERSTOCK, G, C; WILLEMZE, R; van ROOD, J, J. Evolution of acquired severe aplastic anemia to myelodysplasia and subsequent leukemia in adults. **Br J Hematol.** 70:55-62, 1988.
- 55 FRICHOFEN, N; KALTWASSER, J, P; SCHRENMEIER, H; RAGHAVACHAR, A; VOGT, H, G; HERRMANN, F; FREUND, M; MEUSERS, P; SALAMA, A; HEIMPEL, H. Treatment of aplastic anemia with antilymphocyte globulin and methyl-prednisolone with or without cyclosporine. **N Engl J Med.** 324:1297-1304, 1991.
- 56 YOUNG, N; GRIFFITH, P; BRITTAIN, E; ELFENBEIN, G; GARDNER, F; HUANG, A; HARMON, D; HEWLETT, J; FAY, J; MANGN, K; MORRISON, F; SENSENBRENNER, L; SHADDUCK, R; WANG, W; ZAROULIS, C; ZUCKERMAN, K; A multicenter trial of antithymocyte globulin in aplastic anemia and related diseases. **Blood**, 72:1861-1869, 1988.
- 57 GLUCKMAN, E; ESPEROU-BORDEAU, H; BARUCHEL, A; BOOGAERTS, M; BRIERE, J; DONADIO,D; LEVERGER, G; LEPORTIER, M; REIFFERS, J; JANVIER, M; MICHALLET, M; STRYCKMANS, P. Multicenter randomized study comparing ciclosporine-A alone and antithymocyte globulin with prednisone for treatment of severe aplastic anemia. **Blood.** 79:2540-2546, 1992.
- 58 ROOSENFELD, S, J; KIMBALL, J; VINING, D; YOUNG, N, S. Intensive immunosuppression with antithymocyte globulin and cyclosporine as treatment for severe aplastic anemia. **Blood.** 85:3058-3065, 1995.

- 59 SOCIÉ, G; HENRY-AMAR, M; BACIGALUPO, A; HOWS, J; TICHELLI, A; LJUNGMAN, P; McCANN, S, R; FRICKHOFEN, N; VEER-KORTHOF, E, V; GLUCKMAN, E. Malignant tumor occurring after treatment of aplastic anemia. **N Engl J Med.** 329:1152-1157, 1993.
- 60 JOHNSON, F, L. What is the most effective treatment of children with severe aplastic anemia who lack a matched sibling donor? **Bone Marrow Transp.** 18:39-44(Suppl.3),1996.
- 61 RYFFEL, B. Pharmacology of cyclosporine and cellular activation: regulation of intracellular events by cyclosporine. **Pharmacol Rev** 41:407-22, 1989.